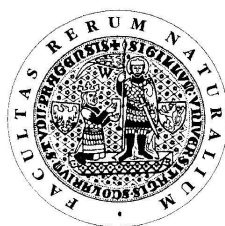


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Miroslav Mikeš

STANOVENÍ SULFAMETHIZOLU POMOCÍ UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD

Determination of sulfamethizole using carbon paste
electrodes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce byla finančně podporovaná Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM0021620857), Univerzitou Karlovou v Praze (projekt SVV 2012-265201) a Grantovou agenturou České Republiky (projekt P206/12/G151).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 18. května 2012.

Klíčová hesla:

voltametrie

HPLC

elektrochemická detekce

uhlíková pastová elektroda

Klíčová slova:

sulfamethizol

diferenční pulsní voltametrie

cyklická voltametrie

ampérometrická detekce

Key Words Plus:

Voltammetry

HPLC

Electrochemical detection

Carbon paste electrode

Key Words:

Sulfamethizole

Differential pulse voltammetry

Cyclic voltammetry

Amperometric detection

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc, kterou mi poskytl při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji své konzultantce Mgr. Haně Dejmkové a dalším členům katedry analytické chemie za pomoc, kterou mi při práci poskytli. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá studiem voltametrického chování sulfamethizolu na uhlíkových pastových elektrodách. Sulfamethizol je sulfonamidové antibiotikum účinné proti řadě gram-pozitivních i gram-negativních bakterií. V medicíně se nejčastěji používá při léčbě močových cest. Z veterinárního hlediska se používá nejen k léčbě, ale zejména jako doplněk stravy jak vodních, tak suchozemských živočichů. Vzhledem k širokému použití a minimální metabolizaci organismem představuje také zátěž pro životní prostředí. Proto je nutný vývoj rychlých a citlivých metod pro stanovení těchto látek v biologických matricích i v lékových formách.

Tato diplomová práce se zabývá nalezením vhodných podmínek pro stanovení sulfamethizolu v tabletě léčiva Micturol sedante, určeného k léčbě močových cest, pomocí diferenční pulsní voltametrie. Metoda využívá prostředí B-R pufru pH 7 a dosahuje meze detekce $0,39 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získané výsledky byly ve shodě s údaji výrobce i s výsledky spektrofotometrického stanovení.

Následně byly optimalizovány podmínky pro stanovení sulfamethizolu v moči. Nalezené podmínky byly: Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), 125×4 mm, (LichroCART), mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol (7:3, V/V) a detekční potenciál +1,3 V. Získaná mez detekce byla $0,041 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. K úpravě vzorku před samotným stanovením byla použita extrakce tuhou fází. Optimální postup extrakce se skládá z nanesení vzorku 100 ml roztoku sulfamethizolu v moči pH 3, z čistícího kroku, kdy je kolonka s adsorbovaným analytem promyta 10 ml 50% methanolu pro odstranění podstatné části interferující matrice a následně z eluce sulfamethizolu 70% methanolem. Dosažená mez detekce v modelových vzorcích moči je $0,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Abstract

The proposed Thesis deals with the electrochemical behavior of sulfamethizole on carbon paste electrodes. Sulfamethizole is a sulfonamide antibiotic effective against a number of gram-positive and gram-negative bacteria. In human medicine, the most frequent application is for the treatment of urinary tract. In veterinary medicine, it is used for the and preventive treatment of both aquatic and terrestrial animals. Due to the wide utilization and low metabolization, it also presents an environmental burden. The development of quick and sensitive methods for the determination in both biological and pharmaceutical matrices is therefore important.

This Thesis deals with the search of optimum conditions for differential pulse voltammetric determination of sulfamethizole in tablets Micturol sedante, used for the treatment of urinary tract. The method uses Britton-Robinson (B-R) buffer pH 7 and reaches detection limit $0,39 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Results of the method complied with the manufacturer's information and with the results of spectrophotometric determination.

In the other part of the work, conditions for the determination of sulfamethizole determination in urine samples. Found conditions were: Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), 125 \times 4 mm, (LichroCART) column, mobile phase B-R buffer pH 3 : methanol (7:3, v/v) and detection potential +1.3 V. Detection limit reached $0,041 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. For the preliminary separation, solid phase extraction was used. Optimum procedure involves extraction of sulfamethizole from 100 ml of urine sample adjusted to pH 3, of cleaning step, when part of the interfering matrix was washed away by 10 ml of 50% methanol and by elution of sulfamethizole by 70% methanol. Detection limit reached using this method in urine samples is $0,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Obsah

1. Cíl práce.....	10
2. Teoretická část.....	11
2.1 Sulfamethizol.....	11
2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti sulfamethizolu.....	11
2.1.2 Sulfonamidy.....	12
2.1.3 Využití sulfamethizolu.....	13
2.1.4 Metody stanovení sulfamethizolu.....	14
2.2 Uhlíkové pastové elektrody.....	15
3. Experimentální část.....	17
3.1 Použité chemikálie.....	17
3.2 Použitá aparatura.....	17
3.3 Další použitá zařízení.....	18
3.4 Pracovní postupy.....	18
3.4.1 Příprava uhlíkové pastové elektrody.....	18
3.4.2 Příprava použitých chemikálií.....	18
3.4.3 Podmínky měření experimentálními technikami.....	19
3.5 Spektrofotometrické zjišťování stálosti zásobního roztoku sulfamethizolu.....	19
4. Výsledky a diskuse.....	21
4.1 Voltametrické měření.....	21
4.1.1 Vliv pH základního elektrolytu.....	21
4.1.2 Pasivace elektrody.....	24
4.1.3 Akumulace sulfamethizolu.....	25
4.1.4 Kalibrační závislost.....	26
4.1.5 Studium mechanismu elektrodové reakce sulfamethizolu.....	29
4.1.6 Vliv rychlosti změny potenciálu.....	32
4.1.7 DPV stanovení sulfamethizolu v tabletě Micturol sedante "fte".....	34
4.1.8 Spektrofotometrické stanovení sulfamethizolu v tabletě Micturol sedante "fte".	36
4.2 HPLC stanovení s elektrochemickou a UV detekcí.....	38
4.2.1 Optimalizace detekce sulfamethizolu.....	38
4.2.2 Kalibrační závislost.....	40
4.2.3 Opakovatelnost měření.....	45

4.3 Optimalizace SPE a stanovení sulfamethizolu v moči.....	47
4.4 HPLC stanovení sulfamethizolu v moči s elektrochemickou a UV detekcí.....	50
5. Závěr.....	56
6. Literatura.....	57

Seznam použitých zkratk

AU	jednotky absorbance
C.A.S.	Chemical Abstract Services
CPE	uhlíková pastová elektroda
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií
pH	vodíkový exponent
R^2	koeficient determinace
RP-18	reverzní fáze s chemicky vázaným oktadecylsilanem
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
λ	vlnová délka elektromagnetického záření
SPE	extrakce na pevné fázi
CZE	kapilární zónová elektroforéza
PAB	paraaminobenzoová kyselina
GC	plynová chromatografie
TLC	tenkovrstevná chromatografie
pKa	kyselá disociační konstanta
DPV	diferenční pulsní voltametrie
CV	cyklická voltametrie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1. Cíl práce

Tato diplomová práce se zabývá nalezením optimálních podmínek pro stanovení sulfamethizolu v čistém stavu a při využití těchto podmínek k určení meze detekce a stanovení sulfamethizolu metodou diferenční pulsní voltametrie (DPV) na CPE.

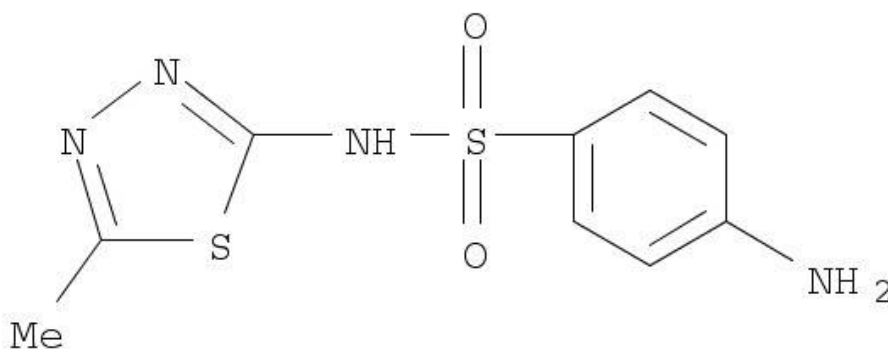
Dále se zabývá studiem mechanismu oxidace sulfamethizolu na uhlíkové pastové elektrodě (CPE) při zvolených hodnotách pH metodou cyklické voltametrie (CV).

Dalším cílem je optimalizovat podmínky pro HPLC stanovení sulfamethizolu s ampérometrickou detekcí v biologické matrici. K tomuto účelu byla použita SPE. Těchto podmínek bylo využito k určení meze detekce sulfamethizolu.

2. Teoretická část

2.1 Sulfamethizol

Strukturní vzorec:



Sumární vzorec: C₉ H₁₀ N₄ O₂ S₂

C.A.S. jméno: 4-amino-*N*-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-benzenesulphonamide

C.A.S. číslo: 144-82-1 [1]

2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti sulfamethizolu

Sulfamethizol je bílý nebo žlutavě bílý krystalický prášek nebo krystaly[2]. Jeden gram prášku lze rozpustit ve 4000 ml vody o pH 6,5, ve 40 g methanolu, 30 g ethanolu, 10 g acetonu, 1370 g etheru nebo ve 2800 g chloroformu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách. Taje při asi 208 °C. Kyselá disociační konstanta je 5,45. Relativní molekulová hmotnost je 270,33[3].

2.1.2 Sulfonamidy

Sulfamethizol je sulfonamidové antibiotikum. Sulfonamidy jsou antibakteriální chemoterapeutika a jsou to první skutečně masově používané sloučeniny proti bakteriálním infekcím.

První důležitý krok v léčení bakteriálních infekcí učinili v roce 1932 Mietsch a Klarer, kteří připravili řadu azobarviv zkoušených na účinnost proti streptokokové infekci Domagkem. Výsledkem této práce bylo zavedení azobarviva Prontosilu se sulfonamidovou skupinou v roce 1935 do praktického použití. Byl to první průmyslově vyráběný sulfonamid. Redukcí v organismu vzniklý sulfanilamid se stal základem celé velké skupiny sulfonamidů, z nichž vhodnými obměnami molekuly byly získány látky krátkodobě až dlouhodobě účinné i sloučeniny těžce resorbovatelné, vhodné pro použití při střevních infekcích[4].

Sulfonamidy jsou skupina syntetických organických sloučenin se širokým spektrem účinnosti. Hojně se používají pro tlumení bakteriálních a protozoálních infekcí u zvířat, zejména infekčních onemocnění trávicí soustavy a dýchacích cest. Podávají se různým druhům zvířat, často v dávkách výrazně vyšších než u antibiotik[5].

Pokud jde o mechanismus účinku, vytěsňují sulfonamidy kompetitivně kyselinu *p*-aminobenzoovou (PAB) při syntéze kyseliny listové, která je důležitým růstovým faktorem mikrobů. Vytěsněním PAB z reakce zabrání sulfonamidy syntéze kyseliny listové a zastavují růst vnímavých mikrobů. Účinek sulfonamidů je tedy bakteriostatický. Sulfonamidy samy jsou z reakce vytěsněny v prostředí s nadbytkem PAB. Vůči sulfonamidům jsou ovšem rezistentní takové mikroorganismy, které využívají preformovanou kyselinu listovou z prostředí, samy ji nesyntetizují[6].

Z hlediska metabolismu se sulfonamidy v organismu částečně váží na bílkovinu plazmy. Je to reverzibilní stav ve stálé rovnováze s nevázaným sulfonamidem. Sulfonamidy vázané na bílkovinu nemají antibakteriální účinek. Na bílkovinu vázaný sulfonamid má charakter určitého deposita, z něhož se sulfonamid postupně uvolňuje.

Sulfonamidy se v organismu zčásti acetylují na aromatické aminoskupině, částečně se oxidují a vylučují z největší části močí jako glukuronidy a sulfáty[4]. Největší význam má acetylace v játrech. Acetylovaný podíl je chemoterapeuticky neúčinný, toxičtější a hůře

rozpustný ve vodě.

Sulfonamidy a jejich metabolity se vylučují glomerulární filtrací ledvinami. Dlouhodobé sulfonamidy se z velkého procenta (až 95%) zpětně resorbují v tubulech, krátkodobé nikoliv. Zejména krátkodobé sulfonamidy a jejich acetylované produkty mohou proto dosáhnout velmi vysoké koncentrace v moči a vyvolat krystalurii[6].

2.1.3 Využití sulfamethizolu

Samotný sulfamethizol je antibiotikum účinné proti řadě gram-pozitivních a gram-negativních bakterií[7]. Používá se především k rychlé léčbě močových cest člověka způsobených *Escherichia coli*. Obvyklá dávka je 1 g sulfamethizolu dvakrát denně. Antibiotikum je organismem dobře snášeno, lehké nežádoucí účinky (nevolnost, průjem) se objevují u 12,8 % sledovaných osob. Bakteriostatické účinky sulfamethizolu byly porovnávány s dalšími léčivy jako jsou pivmecillinam[8] a sulfamethoxazol[9], ale většina příznaků zmizela u cca 90 % osob za téměř stejnou dobu.

Sulfamethizol je vylučován močí a pouze 10 % z celkového množství sulfamethizolu je vylučováno v acetylované formě[10].

Po podání 1 g sulfamethizolu se u sedmi z deseti pozorovaných zdravých dospělých osob maximální koncentrace sulfamethizolu v moči objeví za 0-3 hodiny (rozsah: 528-1857 mg·l⁻¹) a u zbývajících tří subjektů za 3-6 hodin (rozsah: 549-1034 mg·l⁻¹).

Sulfamethizol může být také použit k absorpčnímu testu pro hodnocení motility žaludku[11].

Sulfamethizol je také velmi rozšířený ve veterinární medicíně. Používá se k léčbě skotu, prasat, drůbeže i vodních živočichů. Proto je často stanovován v produktech z chovu zvířat určených jako potrava pro člověka v matricích jako jsou vejce[12], mléko[13,14] a maso (skot, prasata, drůbež, vodní živočichové)[15].

Dále jsou prováděna stanovení reziduí v akvakulturách (sumci, lososi, krevety, korýši), kde jsou vodní živočichové chováni, a také je sledována koncentrace antibiotik, včetně sulfamethizolu, používaných ve veterinárním lékařství[15,16], ve volně žijících živočiších[17], neboť tyto látky se ve velké míře dostávají do životního prostředí.

V případě suchozemských živočichů lze množství reziduí přecházejících do životního prostředí studovat z koncentrace reziduí ve výkalech hospodářských zvířat, které jsou ve velké míře používány ke hnojení zemědělských ploch. Sulfamethizol podléhá

v organismu pouze nepatrné metabolizaci, a tak se v nezměněné formě dostává zpět do životního prostředí. Dochází tak ke znečištění povrchových i podzemních vod. Sulfamethizol může pak být absorbován rostlinami a dostat se do potravního řetězce volně žijících živočichů i do potravního řetězce člověka. Spolupodílí se tak společně s ostatními antibiotiky na vzniku rezistentních bakterií u zvířat i člověka[18].

Řada článků se zabývá tématem, do jaké míry je vhodné používat tato antibiotika v chovech zvířat. Tato léčiva jsou často podávána preventivně a na podporu zvýšení produkce potravin pro člověka. V řadě rozvojových zemí nepodléhá množství antibiotik podávaných zvířatům ve formě potravinových doplňků žádné kontrole[19], proto je nutné vypracovat analytické metody pro přesné stanovení antibiotik v chovu zvířat a detekovat rezidua v životním prostředí.

Evropská unie a další regulační úřady po celém světě vytvořily maximální limity reziduí pro rezidua antibiotik v živočišných produktech vstupujících do potravinového řetězce člověka. Pro Evropu, Kanadu a USA je tato hodnota $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, pro Japonsko je maximální přípustná koncentrace $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ [19].

2.1.4 Metody stanovení sulfamethizolu

V literatuře jsou popsány metody, které většinou umožňují multiresiduální stanovení více analytů na základě podobnosti v chování.

V posledních letech je nejčastěji používanou separační technikou při kontrole sulfonamidových reziduí v potravinách živočišného původu určených pro lidskou spotřebu vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s hmotnostní detekcí[12,16,18]. Dále byla k tomuto účelu také použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinaci s postkolonovou derivatizací a fluorescenční detekcí[15].

Jako účinný doplněk separačních technik HPLC byla pro kontrolu bezpečnosti potravin zavedena také kapilární zónová elektroforéza, a to díky její dobré separační účinnosti, rychlosti analýzy a minimální spotřebě vzorků a rozpouštědel[20].

Další použitelnou chromatografickou technikou je plynová chromatografie (GC)[21]. Tato metoda je méně vhodná vzhledem k nutnosti provedení čistícího kroku a poměrně náročné derivatizace před vlastní analýzou[22].

Dříve používaná metoda chromatografie na tenké vrstvě (TLC) je v současné době nahrazena jinými instrumentálními technikami. Nicméně použití TLC ke kvantifikaci

sulfonamidů může snížit používání rozpouštědel a náklady spojené s analýzou a umožnit projekci většího počtu vzorků. Příprava vzorku pro TLC často zahrnuje SPE a membránové filtrace[23].

2.2 Uhlíkové pastové elektrody

CPE jsou malou, ale významnou skupinou elektrod používaných v elektrochemii. Patří do společné skupiny s běžnými uhlíkovými elektrodami a elektrodami z ušlechtilých kovů a zároveň se řadí do zvláštní skupiny heterogenních uhlíkových elektrod[24,25].

CPE tvoří směs uhlíkového prášku a vhodné pastové kapaliny naplněné do elektrodového pouzdra[24]. Elektrodová pouzdra jsou často vyráběna z polyethylenu či teflonu s vnitřním kovovým pístem, díky kterému je možné po měření pastu jednoduše vytlačit a otřít před dalším měřením, čímž dojde k obnovení povrchu elektrody[26].

Jako uhlíkový prášek se dá využít například grafit nebo mikročástice skelného uhlíku. Obě tyto formy uhlíku splňují základní požadavky, tedy mají stejnou velikost částic, vysokou čistotu a nízkou absorpční schopnost[25]. Jako pastové kapaliny se používají nejčastěji chemicky inertní, elektrochemicky inaktivní a málo těkavé látky, jako například minerální, silikonový a parafrinový olej[24].

Vlastnosti uhlíkové pastové elektrody jsou srovnatelné s vlastnostmi pevných elektrod. Potenciálový rozsah CPE závisí na elektrolytu, v němž je měření prováděno. V kyselých roztocích je potenciálový rozsah v rozmezí od -1,0 V do +1,5 V, v neutrálních roztocích mezi -1,3 V a +1,4 V a v alkalických roztocích od -1,2 V do +1,2 V[25].

Mezi velké přednosti CPE patří velmi nízké hodnoty zbytkových proudů. Rozhodující roli hraje přítomnost pastovací kapaliny. Se snižováním obsahem pastovací kapaliny se vlastnosti CPE přibližují vlastnostem pevných elektrod a vykazují tedy vyšší zbytkové proudy[24].

Ohmický odpor uhlíkové pasty se pohybuje kolem 10 Ω , díky čemuž indikační čidla poskytují rychlou odezvu a stabilní signál[27]. Meze stanovitelnosti na nemodifikovaných CPE jsou obvykle $1 \cdot 10^{-6}$ až $1 \cdot 10^{-7}$ mol \cdot l $^{-1}$ [28]. K výhodám CPE patří jejich snadné používání a nízké pořizovací náklady. Největší výhodou CPE je pak možnost jejich chemické či biologické modifikace. Lze tak s minimálními náklady získat elektrodový materiál s požadovanými vlastnostmi. Podle způsobu modifikace jsou rozlišovány biologicky a chemicky modifikované pastové elektrody, elektrody se

změněným povrchem nebo elektrody modifikované *in situ*. U chemicky modifikovaných dochází k přimíšení modifikujících komponentů přímo do pasty a mají proto speciální jednoúčelové využití. Slouží jako selektivní činidla pro určitou látku či ion. Úpravou povrchu CPE se mění jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Například jeho elektrochemickou aktivací lze zvýšit stupeň reverzibility určitého systému. Aktivované elektrody mají kromě sníženého přepětí i zvýšenou citlivost, čímž je možno snížit mez stanovitelnosti. U modifikace *in situ* dochází pouze k modifikaci povrchové vrstvy uhlíkové pasty. Ta může být po analýze látky odstraněna a čistá CPE použita k dalším účelům.

Nevýhodou CPE je omezené využití v oblasti záporných potenciálů, především z důvodu přítomnosti kyslíku rozpuštěného v pastě[24].

CPE se příliš nehodí pro fyzikálně chemické studie vzhledem k hůře definovanému povrchu uhlíkové pasty[24]. Jako nevýhoda je také uváděna nižší stabilita pasty v roztocích s vysokým obsahem organického rozpouštědla. To lze však vyřešit použitím kuliček skelného uhlíku[28,29].

Vzhledem k četným výhodám, uvedeným v předchozí části, nachází CPE široké využití v elektroanalýze. CPE jsou využívány ve voltametii, ampérometrii a potenciometrii při výzkumu reakčních mechanismů organických i anorganických látek, dále také v chronopotenciometrii při anorganické a organické stopové analýze. Využívají se též pro elektrochemickou detekci při analýze biologicky důležitých sloučenin. CPE speciálních konstrukcí slouží k měření v živých tkáních pokusných zvířat (např. intravenózně u opic či v mozku krysy) v režimu *in vivo*, neboť živé organismy snášejí materiály na bázi uhlíkové pasty příznivě. Stále větší praktický význam má analytická aplikace CPE pro sledování kvality životního prostředí a při kontrole léčiv[30,31].

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

sulfamethizol [4-amino-*N*-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-benzensulfonamid (99%, Sigma-Aldrich)]

methanol (HPLC grade, Merck, Německo)

methanol (p.a., Merck, Německo)

kyselina boritá (min 99,5%, Lachema, Brno)

kyselina fosforečná (85%, $\rho = 1,71 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Lachema, Brno)

octová kyselina (99,8%, $\rho = 1,05 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$,

hydroxid sodný (p.a., Lach-Ner, Neratovice)

mikrokuličky skelného uhlíku o průměru 0,4 – 12 μm (Alpha Aesar, USA)

minerální olej (Fluka Biochemika, Švýcarsko)

deionizovaná voda (Millipore, USA)

3.2 Použitá aparatura

Pro voltametrická měření byla použita aparatura Eco-Tribo Polarograph ovládaná softwarem PolarPro verze 5.1 (Polaro-Sensors, Praha, ČR). Bylo použito tříelektrodové zapojení s platinovou pomocnou elektrodou, referenční argentchloridovou elektrodou ($3 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl) a pracovní uhlíkovou pastovou elektrodou (CPE) pístového typu (tělo teflonové s nerezovým pístem pro vytlačení pasty, aktivní plocha kruhová o průměru 3 mm).

Pro HPLC měření byla použita vysokotlaká gradientová pumpa Beta. K dávkování vzorku na kolonu Lichrospher[®] RP-18, 100 (5 μm), 125×4 mm, (LichroCART) byl použit dávkovač typu LCI 30 se smyčkou o objemu 20 μl (Laboratorní přístroje, Praha). Mobilní fáze tvořená směsí B-R pufr : methanol byla před vstupem na kolonu odplyněna pomocí odplyňovače mobilní fáze typu DG 3014. K UV detekci byl použit UV/VIS detektor Sapphire při vlnové délce absorpčního maxima sulfamethizolu (277 nm), získané při sledování stability zásobního roztoku. Za UV detektorem byl sériově zapojen

ampérometrický detektor ADLC1 v tříelektrodovém zapojení (Laboratorní přístroje, Praha) typu wall-jet se stejnými elektrodami, jako při voltametrickém měření.

3.3 Další použitá zařízení

Spektrofotometr: Agilent Technologies 8453

pH metr: digitální měřicí přístroj Conductivity and pH metr 3510 (Jenway, UK) s kombinovanou skleněnou elektrodou

Magnetická míchačka: Magnetic Stirrer MS 3000 (Jenway, UK)

Ultrazvuková čistička: ultrazvuková čistička PSO2000A (Powersonic, USA)

3.4 Pracovní postupy

3.4.1 Příprava uhlíkové pastové elektrody

Před přípravou uhlíkové pastové elektrody byl nejprve důkladně vyčištěn zásobník elektrodového pouzdra za použití acetonu.

Poté byla připravena uhlíková pasta smísením 250 mg mikrokuliček skelného uhlíku a 100 μ l minerálního oleje a obě komponenty byly několik minut homogenizovány pomocí tloučku v třecí misce. Po malých dávkách a za důkladného pěchování byla vpravena uhlíková pasta do zásobníku elektrodového pouzdra uhlíková elektroda pístového typu, tělo teflonové s nerezovým pístem pro vytlačení pasty, aktivní plocha kruhová o průměru 3 mm. Elektroda naplněná čerstvou pastou se ponechala na 24 hodin ustálit.

3.4.2 Příprava použitých chemikálií

Příprava zásobního roztoku a roztoků připravených ředěním

Zásobní roztok 4-amino-*N*-(5-methyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl)-benzensulfonamidu (99%, Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním přesně odváženého množství látky v destilované vodě za použití ultrazvuku. Stálost zásobního roztoku byla sledována spektrofotometricky. Roztoky pro voltametrická měření byly připraveny odpipetováním potřebného množství zásobního roztoku do odměrné baňky a

doplněním po rysku B-R tlumivým roztokem o příslušném pH. Pro průtoková měření byly roztoky připraveny ředěním mobilní fáze. Všechny roztoky byly uchovány ve tmě v lednici při teplotě 5 °C.

Příprava Brittonova – Robinsonova (B-R) pufru

B-R pufr byl připraven smísením kyselé složky, obsahující octovou kyselinu, kyselinu fosforečnou a boritou o koncentraci každé ze složek $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a zásadité složky, obsahující hydroxid sodný o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro přípravu mobilních fází byly tyto složky použity po desetinásobném zředění. B-R pufr požadovaného pH byl připraven vždy těsně před použitím za použití pH metru.

3.4.3 Podmínky měření experimentálními technikami

Bylo sledováno elektrochemické chování sulfamethizolu metodou diferenční pulsní a cyklické voltametrie. Pro diferenční pulsní voltametrii byly nastaveny následující parametry pulsu: výška pulsu 80 mV a šířka pulsu 50 ms a $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ měření. Cyklická voltametrie byla měřena s rychlostí skenu $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, není-li uvedeno jinak. Měření bylo prováděno v rozsahu potenciálů od + 200 mV do konce příslušného potenciálového okna.

Všechna měření byla provedena nejméně třikrát. Povrch pracovní uhlíkové pastové elektrody byl obnovován po každém měření pomocí navlhčeného filtračního papíru.

3.5 Spektrofotometrické zjišťování stálosti zásobního roztoku sulfamethizolu

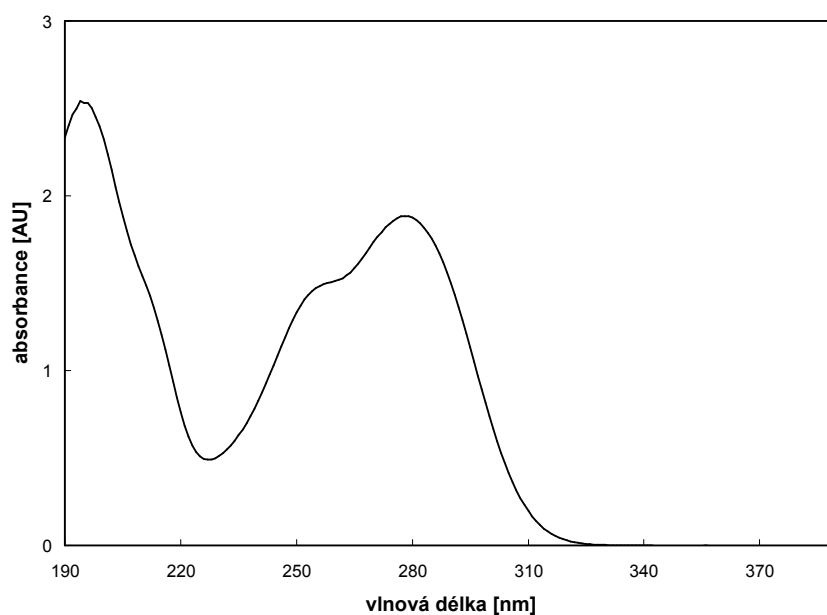
Kontrola stálosti MCP byla provedena pomocí spektrofotometru Agilent Technologies 8453. Absorpční spektrum studované látky bylo proměřeno v zásobním roztoku sulfamethizolu v destilované vodě proti destilované vodě. Měření bylo prováděno v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm v rozmezí vlnových délek 190 až 600 nm. Změřené spektrum je uvedeno na obrázku 3.5.1. Absorbance byla sledována při vlnové délce absorpčního maxima v průběhu přibližně deseti měsíců. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.5.1.

Z naměřených hodnot lze soudit, že studovaný roztok je stálý po dobu nejméně

deseti měsíců, pokud je uchováván v temnu při teplotě 5 °C.

Tab. 3.5.1 Stálost zásobního roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v destilované vodě

čas [dny]	absorbance ($\lambda = 277 \text{ nm}$) [AU]	procento původní odezvy [%]
1	1,884	100
3	1,879	99,7
5	1,865	99,0
15	1,884	100
30	1,825	96,9
90	1,843	97,8
310	1,850	98,2



Obr. 3.5.1 UV-VIS spektrum sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve vodě (měřeno proti vodě) v kyvetě o tloušťce 1 mm.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Voltametrická měření

4.1.1 Vliv pH základního elektrolytu

Vliv pH na voltametrické chování sulfamethizolu pomocí diferenční pulsní voltametrie byl sledován v prostředí B-R pufru pH 2 až 12 s krokem po jednotce pH. K tomuto účelu byl použit $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok sulfamethizolu v B-R pufru daného pH.

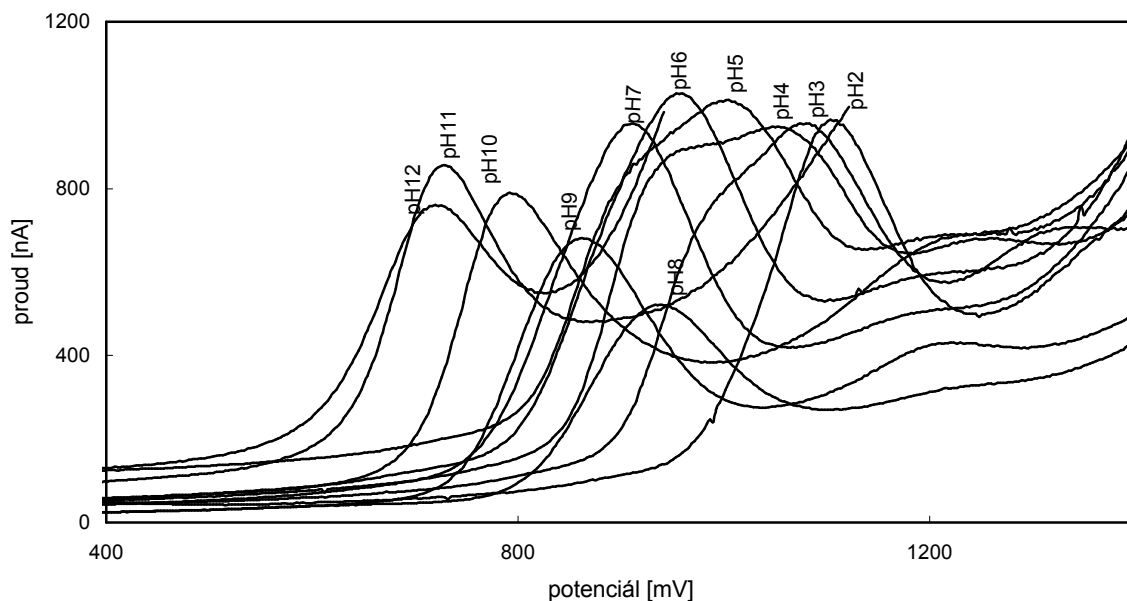
Naměřené voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 4.1.1. Ze získaných voltamogramů je zřejmý posun píků po potenciálové ose se zvyšujícím se pH směrem k nižším potenciálům. Při pH 3, 4, 5 a 6 je možné také pozorovat dělení hlavního píku, způsobené protonizací některé funkční skupiny sulfamethizolu v okolí pK_a (5,45). Při pH 10 až 12 se objevuje zřetelný nárůst proudu pozadí způsobený oxidací základního elektrolytu.

Závislosti proudu a potenciálu na pH pro hlavní pík, pík následující za píkem analytu i pro pík vznikající dělením hlavního píku jsou zobrazeny na Obr. 4.1.2 a Obr. 4.1.3. Změna výšky píku se změnou pH nemá lineární charakter. V oblasti pH 2 až 7 má závislost proudu na pH parabolický průběh s minimem při pH 4 a v oblasti pH 7 až 12 s maximem při pH 10. Tento trend zřejmě souvisí s protonizací funkčních skupin v kyselé oblasti a deprotonizací v oblasti bazických pH.

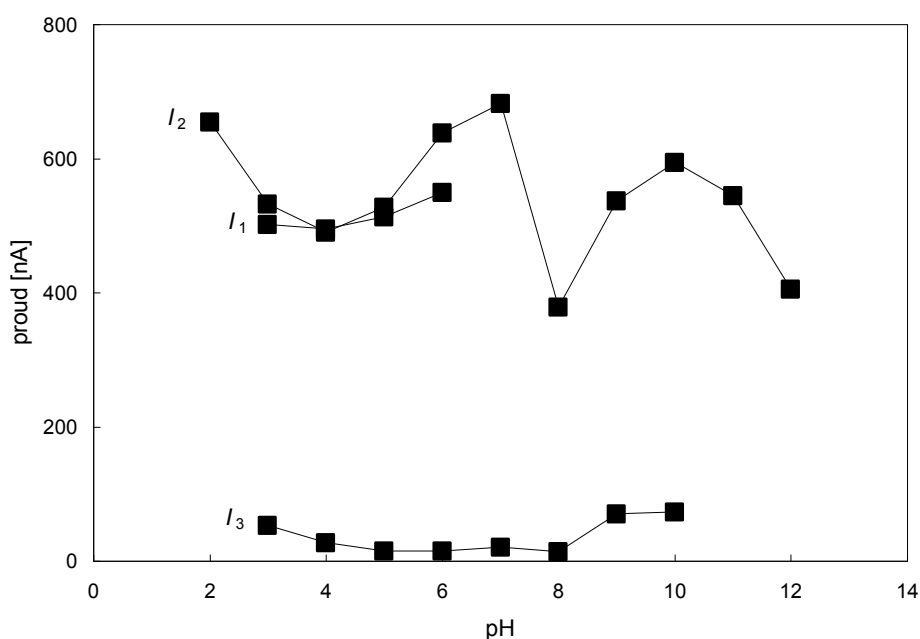
Změna potenciálu maximální proudové odezvy vykazuje lineární charakter s poklesem potenciálů potřebných pro zoxidování analytu v oblasti pH od 2 až 7 a tento trend se opakuje od pH 8 k pH 12.

Pík následující za píkem analytu vykazuje stejné závislosti proudu i potenciálu na pH jako hlavní pík sulfamethizolu. Tento pík se na záznamu objevuje při pH 2 až 10. Při pH 11 a 12 se tento pík neobjevuje, protože se ztrácí na úniku základního elektrolytu.

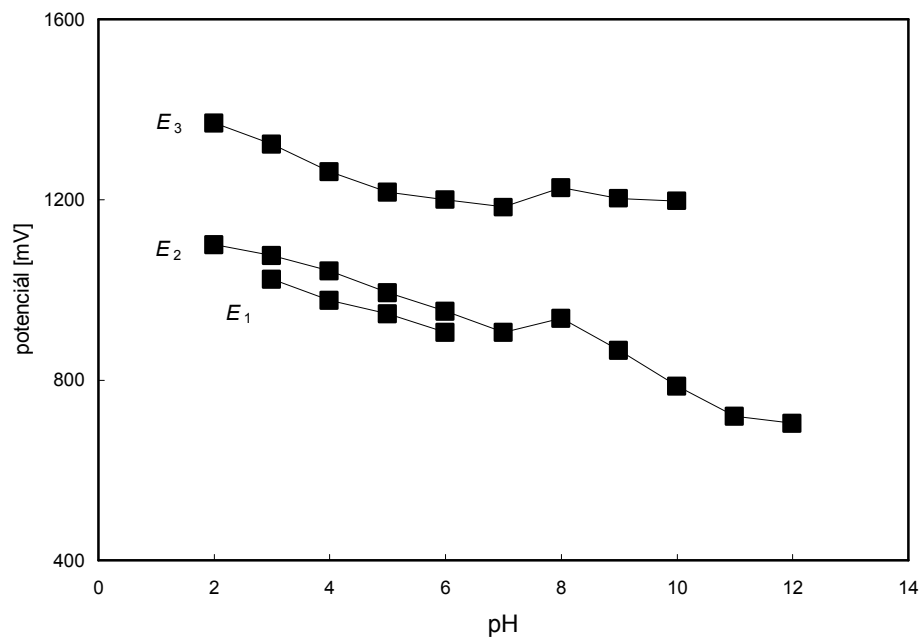
Pro následující měření bylo po vyhodnocení voltamogramů a závislostí potenciálu a proudu na pH zvoleno pH 7, protože při tomto pH poskytuje oxidace sulfamethizolu největší proudovou odezvu a nedochází k dělení hlavního píku.



Obr. 4.1.1 Voltamogramy sulfamethizolu pro rozmezí pH 2 až 12. Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr. Měřeno technikou DPV na CPE.



Obr. 4.1.2 Závislost velikosti proudové odezvy sulfamethizolu (I_1 až I_3) na pH v rozmezí 2 až 12 (po jednotce pH). Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr. Měřeno technikou DPV na CPE.

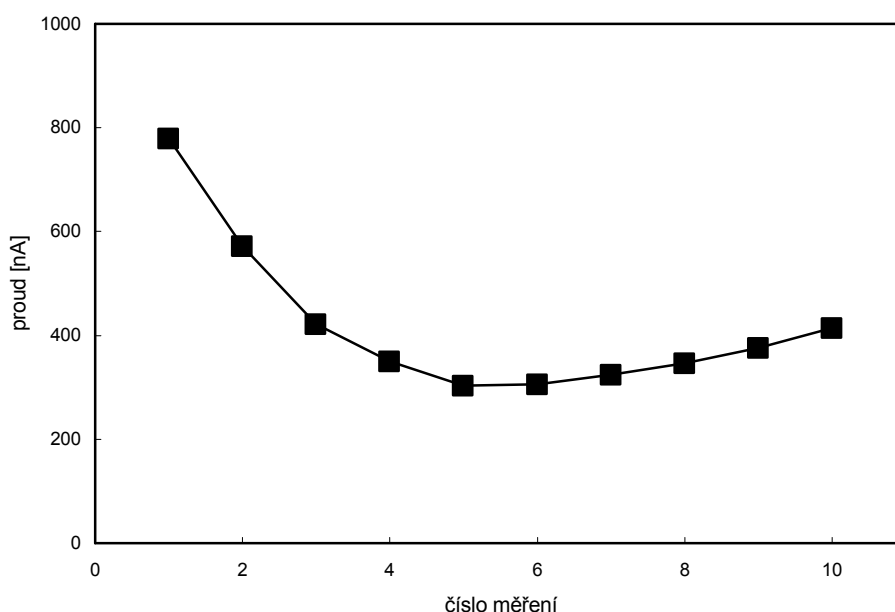


Obr. 4.1.3 Závislost potenciálu maximální proudové odezvy (E_1 až E_3) na pH v rozmezí 2 až 12 (po jednotce pH). Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr. Měřeno technikou DPV na CPE.

4.1.2 Pasivace elektrody

Pro zjištění míry pasivace CPE produkty elektrodoých reakcí bylo provedeno deset opakovaných měření bez obnovování povrchu pracovní elektrody při pH 7 základního elektrolytu (Obr. 4.1.4). K tomuto účelu byl opět použit $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok sulfamethizolu. Mezi měřeními byl roztok 10 s promíchán kvůli zajištění transportu analytu k povrchu elektrody

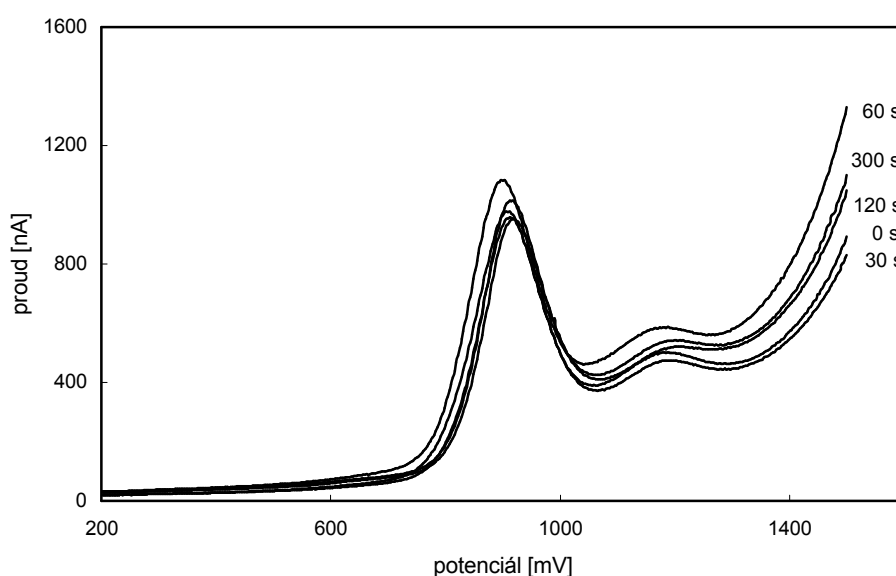
Se zvyšujícím se číslem měření proudová odezva sulfamethizolu nejprve poměrně rychle klesala (měření 1 až 5), ale následně se proudová odezva začala mírně zvyšovat. To by mohlo být způsobeno interakcí analytu s oxidačním produktem nahromaděným na povrchu elektrody v průběhu prvních pěti měření. Tento jev nebyl dále studován, neboť účelem tohoto měření bylo zjistit, zda-li je nutné obnovovat povrch elektrody po každém měření a k tomuto účelu postačuje prvních pět měření. Povrch elektrody musí být tedy obnovován po každém měření.



Obr. 4.1.4 Pasivace elektrody (10 opakování) - závislost proudové odezvy sulfamethizolu na počtu opakování měření bez obnovování povrchu elektrody. Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr pH 7. Měřeno technikou DPV na CPE.

4.1.3 Akumulace sulfamethizolu

Následně byla ověřena možnost adsorpce analytu na pracovní uhlíkovou pastovou elektrodu za účelem možného zvýšení citlivosti stanovení. Elektroda byla před měřením ponořena po dobu 0, 30, 60, 120 a 300 sekund do míchaného roztoku. Akumulační čas neměl na velikost signálu sulfamethizolu žádný vliv, jak je zřejmé i z Obr. 4.1.5. K adsorpci sulfamethizolu na povrchu uhlíkové pastové elektrody v prostředí B-R pufru pH 7 tedy nedochází.



Obr. 4.1.5 Studium akumulace sulfamethizolu (0, 30, 60, 120, 300 sekund) – závislost proudové odezvy sulfamethizolu na době akumulace (roztok míchán v průběhu doby akumulace). Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr pH 7. Měřeno technikou DPV na CPE.

4.1.4 Kalibrační závislost – DPV

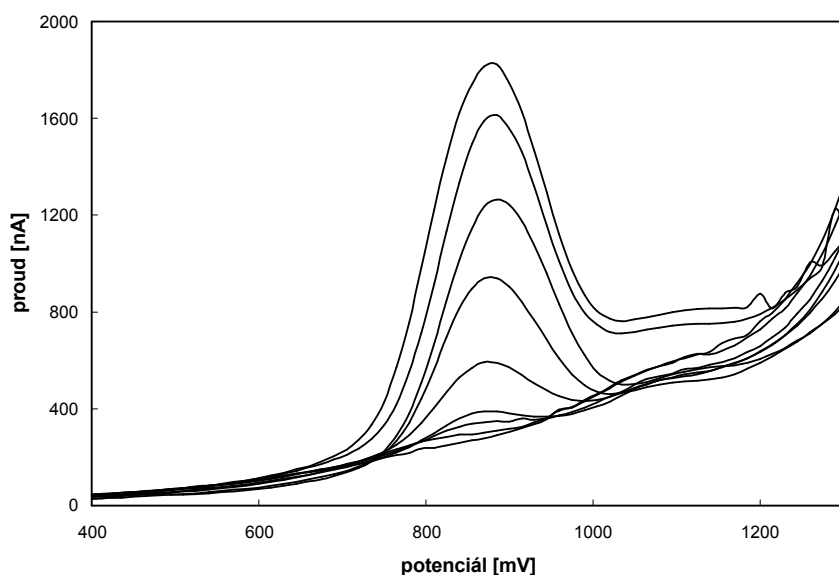
Za zjištěných vhodných podmínek pro elektrochemickou detekci sulfamethizolu metodou DPV (B-R pufr pH 7, rychlost polarizace $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) byla proměřena koncentrační závislost v rozmezí 4 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Parametry kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí 4 až $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 10 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 4 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly zpracovány metodou lineární regrese. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.1.1.

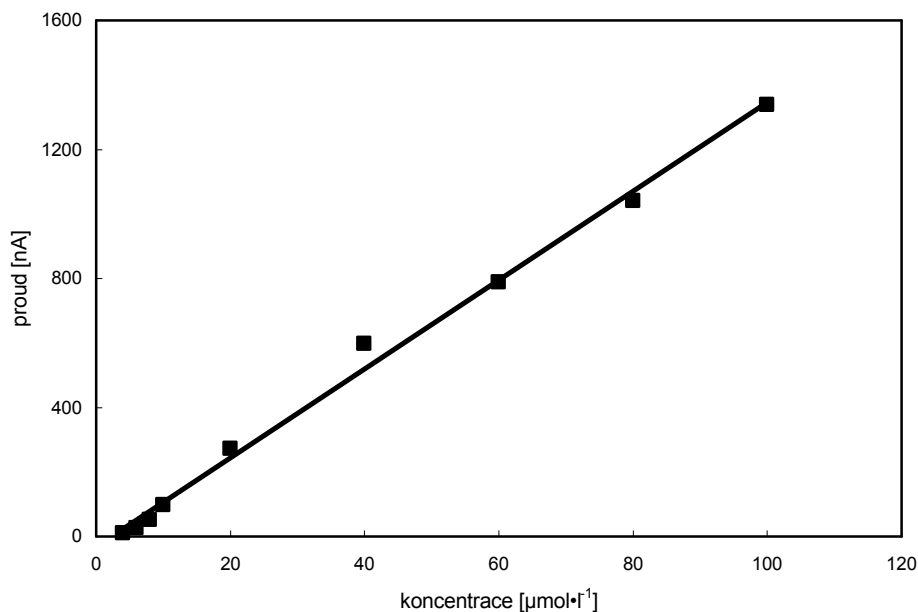
Voltamogramy sulfamethizolu v rozmezí koncentrací 4 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou uvedeny na Obr. 4.1.6. Kalibrační závislost z výšek píků pro rozmezí koncentrací sulfamethizolu 4 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je ukázána na Obr. 4.1.7. Na Obr. 4.1.8 je pak zobrazena koncentrační závislost zpracovaná v logaritmické formě v celém kalibračním rozsahu (4 až $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Koeficienty determinace se pohybují v rozmezí 0,9542 až 0,9951. Nízká hodnota koeficientu determinace u nejnižšího koncentračního rozmezí je způsobena šumem základní linie a tedy větší chybou při odečtu z voltamogramu a také polohou píku na úniku základního elektrolytu. Kalibrační závislosti vykazují poměrně dobrou linearitu v celém koncentračním rozsahu.

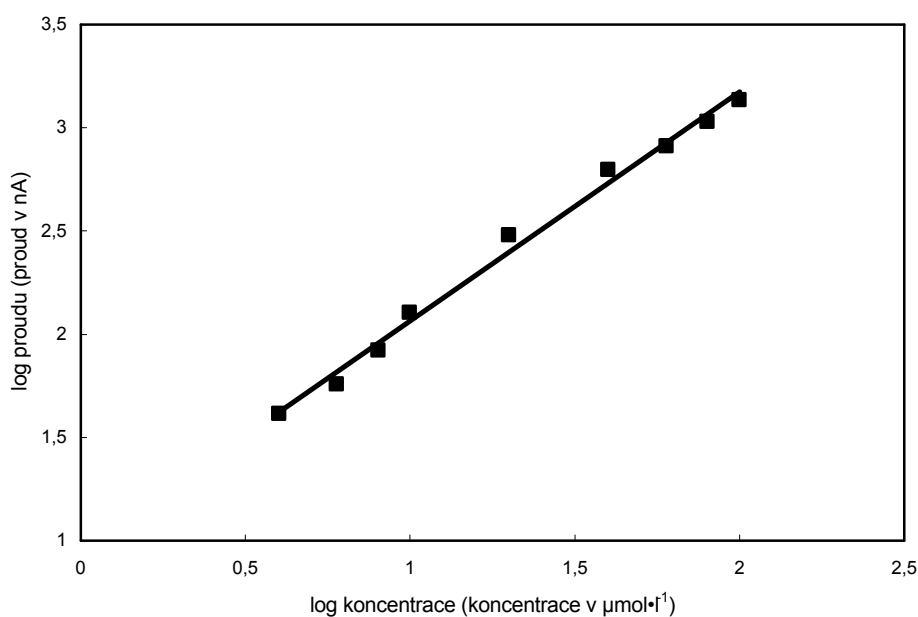
Dosažená mez detekce je $0,39 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Obr. 4.1.6 Voltamogramy sulfamethizolu v rozmezí koncentrací 4, 6, 8 10, 20, 40, 60, 80, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (křivky v pořadí nad sebou). Základní elektrolyt je B-R pufr pH 7, rychlost polarizace $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CPE.



Obr. 4.1.7 Kalibrační závislost sulfamethizolu pro koncentrační rozmezí 4 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Základní elektrolyt je B-R pufr pH 7, rychlost polarizace 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CPE.



Obr. 4.1.8 Kalibrační závislost sulfamethizolu v logaritmické formě pro koncentrační rozmezí 4 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Základní elektrolyt je B-R pufr pH 7, rychlost polarizace 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CPE.

Tab. 4.1.1 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení sulfamethizolu: Měřeno technikou DPV na CPE

Koncentrační rozmezí [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [nA· $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	R^2
4 – 10	14,3	- 51,9	0,9542
10 – 100	13,3	2,6	0,9941
4 – 100	13,8	- 30,8	0,9951

Závislost log proudu na log koncentrace: směrnice: 1,11 ; úsek: 0,96; R^2 : 0,9923.

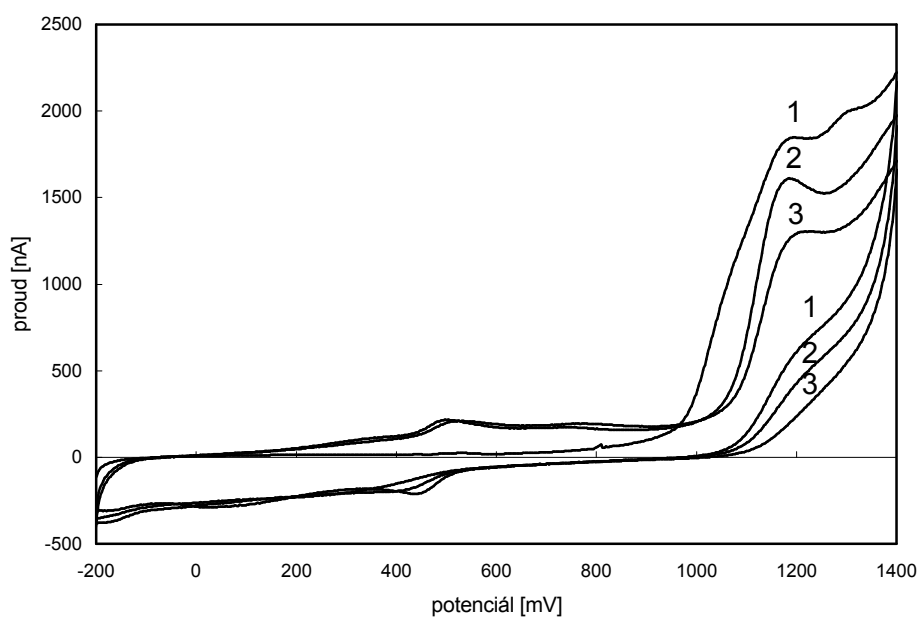
4.1.5 Studium mechanismu elektrodové reakce sulfamethizolu

Elektrochemické chování sulfamethizolu bylo sledováno při pH 2, 5, 7, 12 základního elektrolytu (B-R pufr). Kromě kyselého, neutrálního a zásaditého pH bylo zvoleno pH 5, protože při tomto pH došlo při DPV k výraznému dělení hlavního píku a můžeme tedy očekávat zajímavé elektrochemické chování.

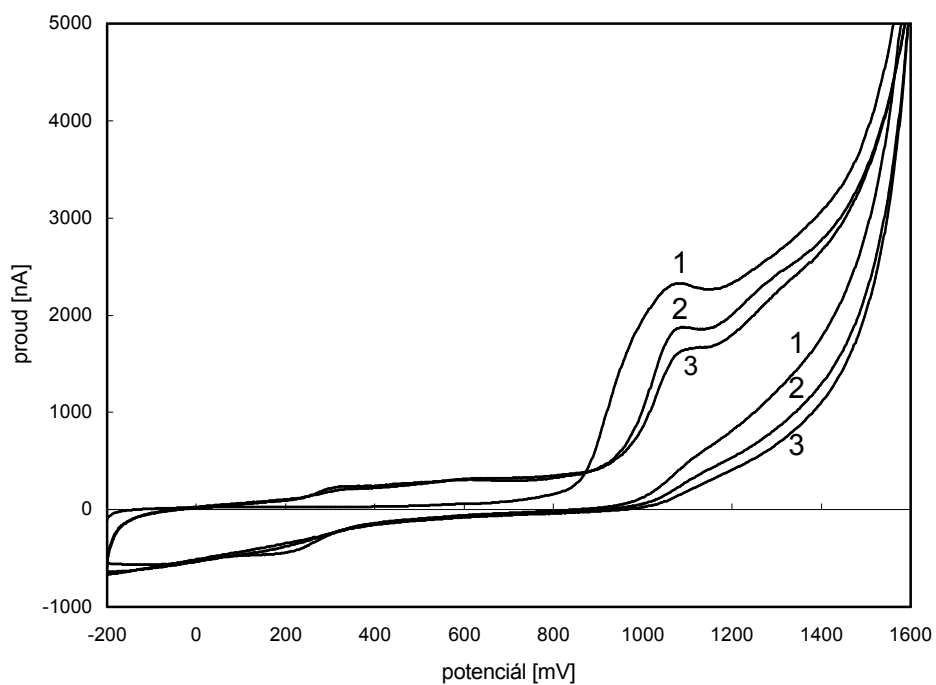
S rostoucím pH základního elektrolytu se píky opět posouvaly směrem k zápornějším potenciálům. Výška píků měla stejný trend jako v případě DPV za odpovídajících podmínek měření.

Za účelem studia mechanismu elektrodové reakce analytu byly pomocí cyklické voltametrie proměřeny vždy 3 po sobě okamžitě následující cykly při rychlosti polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ a při zvolených hodnotách pH 2 (Obr. 4.1.9), 5 (Obr. 4.1.10), 7 (Obr. 4.1.11) a 12 (Obr. 4.1.12).

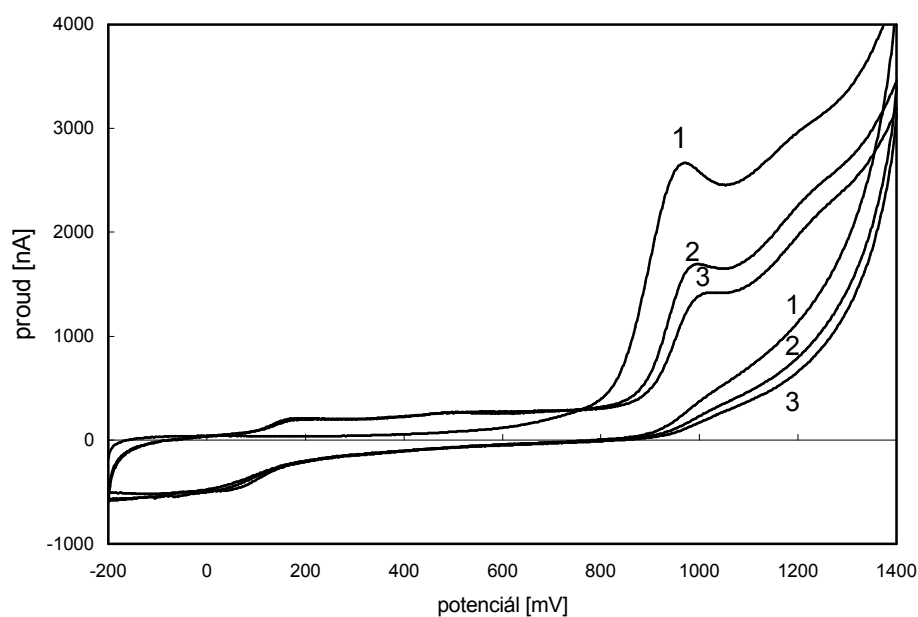
Na voltamogramu při pH 2 základního elektrolytu je zřetelný pík odpovídající oxidaci aminoskupiny přítomné v molekule sulfamethizolu, za tímto hlavním píkem se objevuje nevýrazný další pík. Hlavní probíhající reakce je ireverzibilní, protože chybí odpovídající redukční pík. Produkty vzniklé při této reakci jsou ale redukovány při nižších potenciálech, kde je na druhém a třetím cyklu měření patrná dvojice kvazireverzibilního oxidačního a redukčního píku. Prvotní reakce odpovídá oxidaci aromatické aminoskupiny; přítomnost páru píků by mohla naznačovat vznik azoderivátu a jeho redukci na hydrazoderivát. Podobný průběh mají i voltamogramy vzniklé v prostředí o pH 5 a 7. V prostředí o pH 5 bylo na základě výsledků DPV očekáváno větší množství píků, ale jejich existence je spíše jen naznačená. V zásaditém prostředí o pH 12 chybí jak píky při vyšším potenciálu, které se ztrácí na úniku základního elektrolytu, tak i dvojice píků při nižším potenciálu.



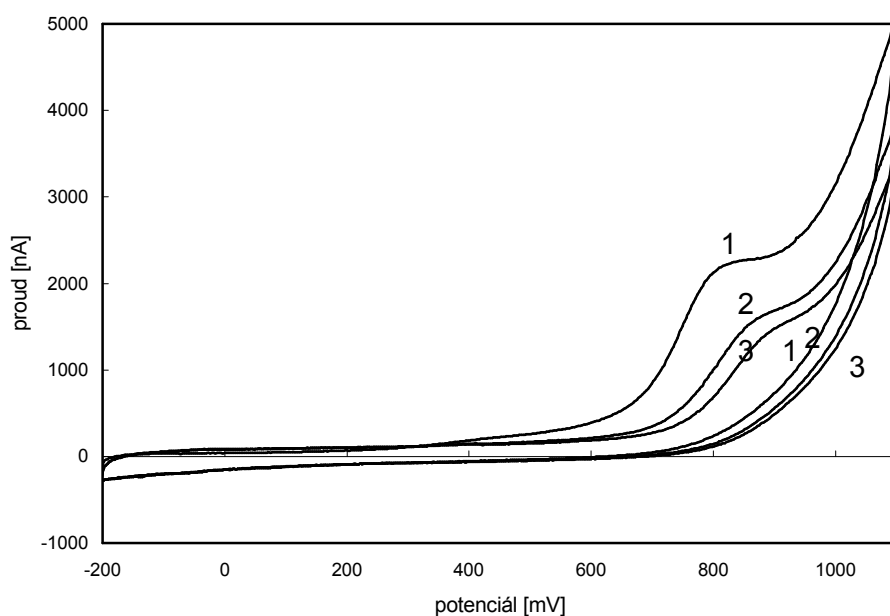
Obr. 4.1.9 Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sulfamethizolu (3 cykly), základní elektrolyt B-R pufr pH 2, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou CV na CPE.



Obr. 4.1.10 Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sulfamethizolu (3 cykly). Číslo 1 až 3 představují číslo cyklu. Základní elektrolyt B-R pufr pH 5, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou CV na CPE.



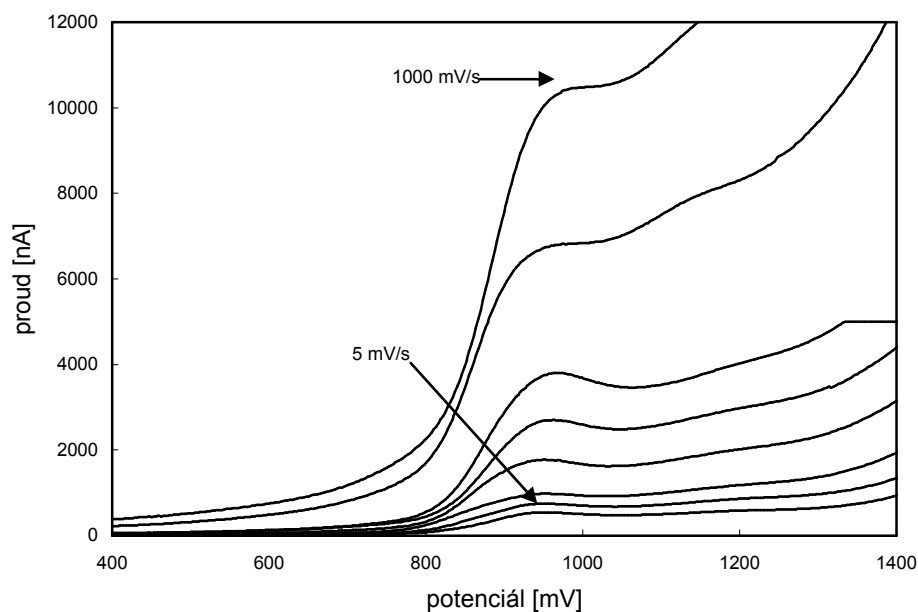
Obr. 4.1.11 Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sulfamethizolu (3 cykly). Číslo 1 až 3 představují číslo cyklu. Základní elektrolyt B-R pufr pH 7, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou CV na CPE.



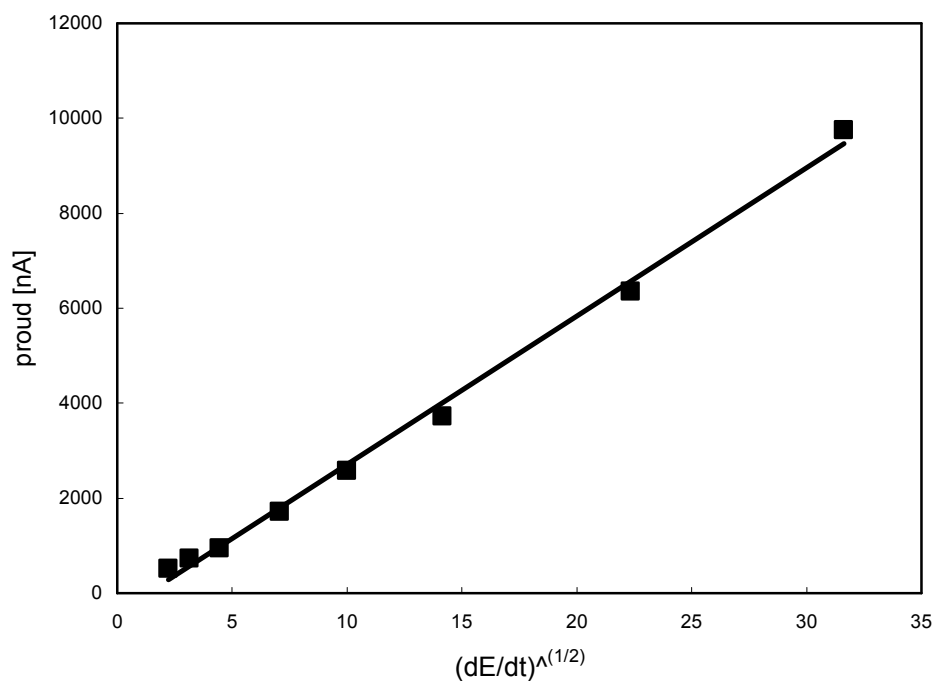
Obr. 4.1.12 Voltamogramy $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ sulfamethizolu (3 cykly). Číslo 1 až 3 představují číslo cyklu. Základní elektrolyt B-R pufr pH 12 rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou CV na CPE.

4.1.6 Vliv rychlosti změny potenciálu

Pro určení, jakým krokem je řízena oxidace sulfamethizolu v B-R pufru o pH 7, byly naměřeny cyklické voltamogramy pro rychlost polarizace 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Píky odpovídající oxidaci studovaného analytu pro všechny zkoušené rychlosti polarizace jsou zobrazeny na Obr. 4.1.13. Vynesením závislosti výšky píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace byl zjištěn elektrodový děj, kterým je řízena oxidace sulfamethizolu. Z linearity této závislosti je zřejmé, že oxidace sulfamethizolu je děj řízený difuzí, protože zde existuje přímá úměra mezi výškou píku a druhou odmocninou z rychlosti polarizace, jak je vidět na obrázku 4.1.14.



Obr. 4.1.13 Závislost proudové odezvy sulfamethizolu na rychlosti polarizace (1. část cyklu) - 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr pH 7. Měřeno technikou CV na CPE.

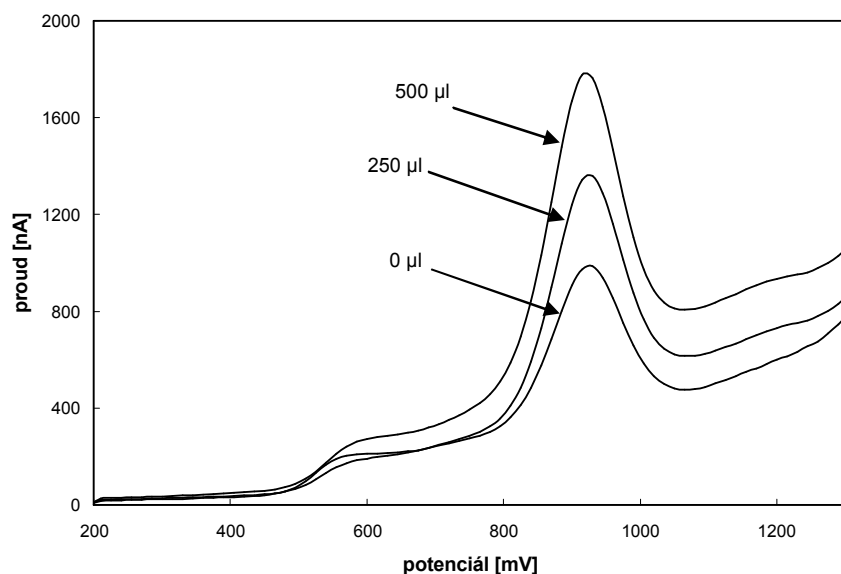


Obr. 4.1.14 Závislost výšky píku na odmocnině z rychlosti polarizace pro rychlosti polarizace 5, 10, 20, 50, 100, 200 a 1000 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Koncentrace sulfamethizolu je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, základní elektrolyt B-R pufr pH 7. Měřeno technikou CV na CPE.

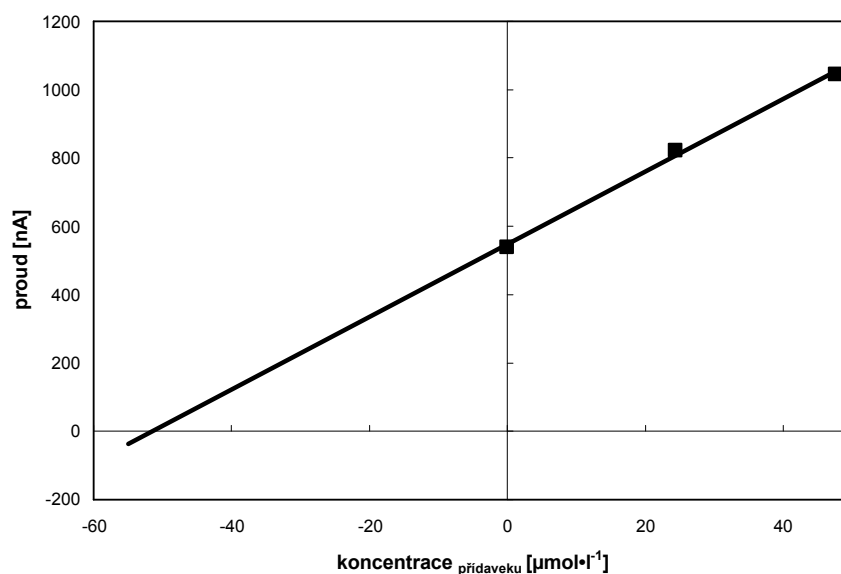
4.1.7 DPV stanovení sulfamethizolu v tabletě Micturol sedante "fte"

Pro stanovení sulfamethizolu v reálném vzorku byla použita tableta léčiva Micturol sedante "fte" používaná k léčbě močových cest člověka.

Studovaná tableta léčiva byla rozpuštěna ve 100 ml methanolu za použití ultrazvuku. Z tohoto roztoku bylo poté odebráno 50 μl a doplněno do 10 ml B-R pufru pH 7. Takto připravený roztok byl poté převeden do voltametrické nádoby a za optimálních podmínek pro stanovení sulfamethizolu, použitých pro proměření kalibrační závislosti metodou DPV, byl tento roztok proměřen. Pro zjištění skutečné koncentrace sulfamethizolu v léčivu byla použita metoda standardního přídatku (250 μl a 500 μl $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zásobního roztoku sulfamethizolu ve vodě), odpovídající voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 4.1.15. Závislost proudové odezvy sulfamethizolu na standardním přídatku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 μl) je na Obr. 4.1.16. Výše uvedeným postupem byly proměřeny 3 tablety léčiva. Naměřené hodnoty proudů byly přepočítány na změnu objemu roztoku a byla vypočtena skutečná hmotnost sulfamethizolu v tabletě léčiva $255,9 \pm 19,7 \text{ mg}$. Tato metoda stanovení sulfamethizolu lze s výhodou použít pro stanovení sulfamethizolu v tabletě léčiva, neboť nevyžaduje předběžnou filtraci po rozpuštění tablety léčiva. Je rychlá, poměrně přesná a nevyžaduje náročnou instrumentaci.



Obr. 4.1.15 Tableta léčiva Micturol sedante "fte" – závislost proudové odezvy sulfamethizolu na standardním přídávku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 μl). Základní elektrolyt je B-R pufr pH 7, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CPE.

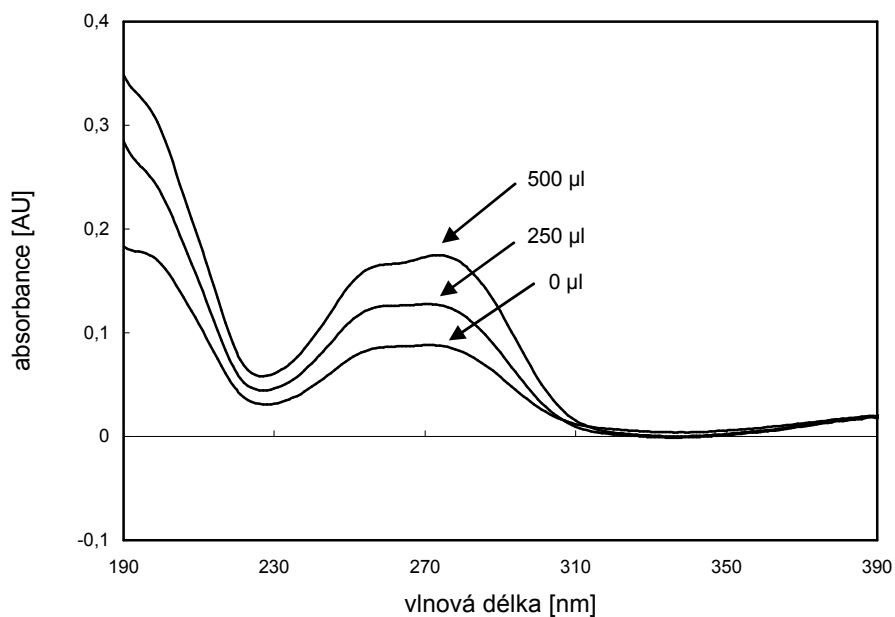


Obr. 4.1.16 Tableta léčiva Micturol sedante "fte" – závislost proudové odezvy sulfamethizolu na standardním přídávku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 μl). Základní elektrolyt B-R pufr pH 7, rychlost polarizace $100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Měřeno technikou DPV na CPE.

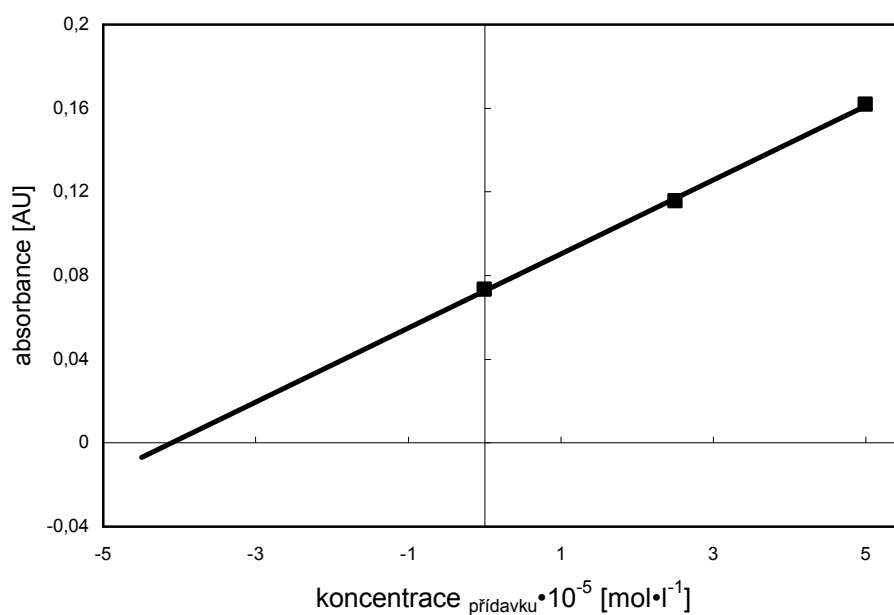
4.1.8 Spektrofotometrické stanovení sulfamethizolu v tabletě Micturol sedante "fte"

Spektrofotometrické stanovení sulfamethizolu v tabletě léčiva slouží pouze pro kontrolu výsledků získaných metodou diferenční pulsní voltametrie, která byla pro toto stanovení optimalizována.

Pro stanovení sulfamethizolu v tabletě léčiva byly použity stejné roztoky léčiva jako při stanovení metodou DPV. Z tohoto roztoku bylo (po zfiltrování – stříkačkový filtr ProFill PTFE / 0,45 μm , Fischer Scientific) odebráno 50 μl a převedeno do 10 ml odměrné baňky a doplněno do 10 ml vodou. Takto připravený roztok byl poté převeden do křemenné kyvety měrné tloušťky 1 mm a proměřen. Pro zjištění skutečné koncentrace sulfamethizolu v léčivu byla použita opět metoda standardního přídatku (250 μl a 500 μl $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zásobního roztoku sulfamethizolu ve vodě). Závislost absorbance na standardním přídatku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 μl) je uvedena na Obr. 4.1.17 a Obr. 4.1.18. Tento postup byl zopakován se zbylými dvěma roztoky léčiva. Ze získaných závislostí absorbance na objemu standardního přídatku (koncentraci sulfamethizolu v roztoku), byla vypočtena hmotnost sulfamethizolu v tabletě léčiva $258,5 \pm 22,7 \text{ mg}$.



Obr. 4.1.17 Tableta léčiva Micturol sedante "fte" – závislost absorbance sulfamethizolu na standardním přídávku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 µl). K měření byla použita křemenná kyveta měrné tloušťky 1 mm.



Obr. 4.1.18 Tableta léčiva Micturol sedante "fte" – závislost absorbance sulfamethizolu na standardním přídávku $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu (0, 250, 500 µl). K měření byla použita křemenná kyveta měrné tloušťky 1 mm.

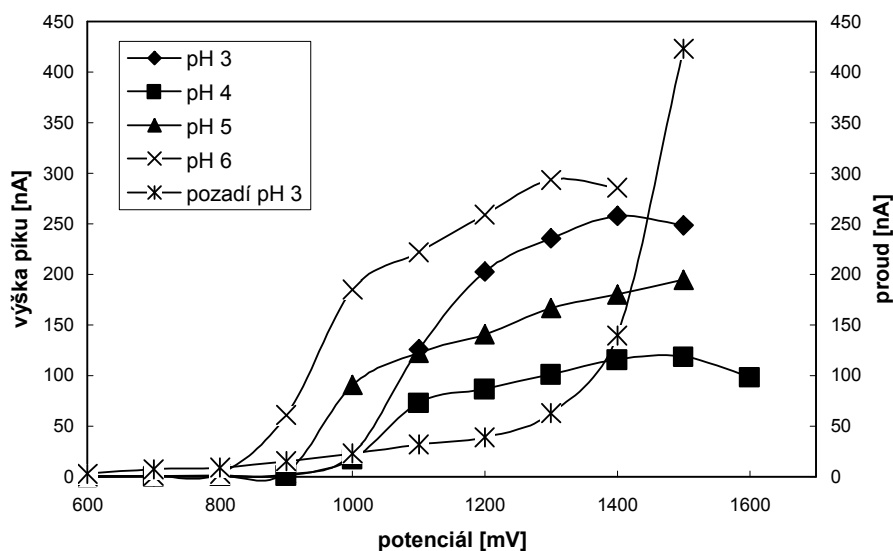
4.2 HPLC stanovení s elektrochemickou a UV detekcí

4.2.1 Optimalizace detekce sulfamethizolu

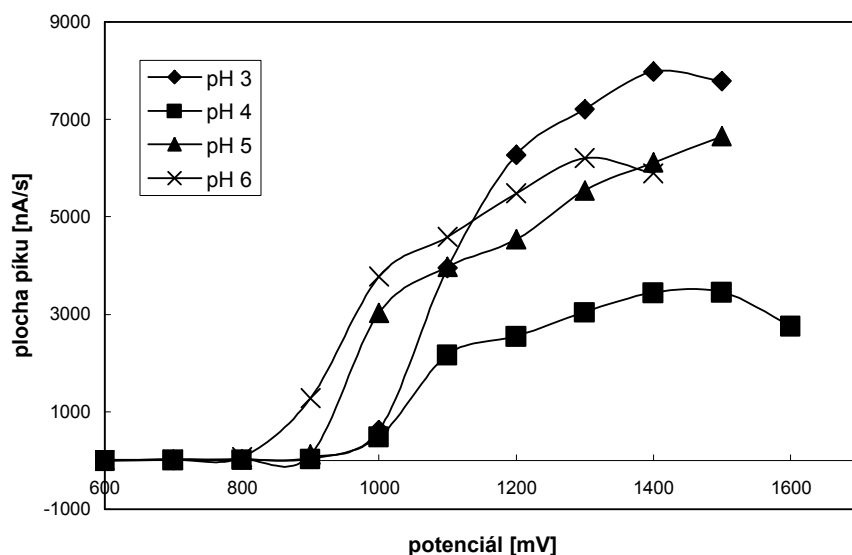
Nejprve byl zkoumán vliv pH mobilní fáze na elektrochemické a chromatografické chování sulfamethizolu. Měření probíhalo v mobilní fázi složené z B-R pufru pH 3 až 6 a methanolu v poměru 7:3. Průtoková rychlost mobilní fáze byla $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, koncentrace dávkovaného analytu v mobilní fázi $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a dávkovaný objem $20 \text{ } \mu\text{l}$. Spektrometrická detekce byla prováděna při vlnové délce 277 nm . Při každém pH byly změřeny hydrodynamické voltamogramy v rozmezí potenciálů $+0,6$ až $+1,6 \text{ V}$ s krokem po $0,1 \text{ V}$. Všechna měření byla prováděna při nastavené citlivosti $1 \mu\text{A/V}$. Při změně mobilní fáze byl obnovován povrch elektrody.

Na obr. 4.2.1 a obr. 4.2.2 jsou znázorněny hydrodynamické voltamogramy při uvedených pH B-R pufru v mobilní fázi.

Ze zjištěných údajů byly získány vhodné podmínky pro následné měření reálných vzorků (sulfamethizol v moči). pH B-R pufru v mobilní fázi bylo nastaveno na pH 3 z důvodu malé retence sulfamethizolu na HPLC koloně. Při pH 3 se analyt zadržuje nejvíce (retenční čas je cca 3 min). Vhodný potenciál ($+1,3 \text{ V}$) pro elektrochemickou detekci byl zvolen vyhodnocením hydrodynamických voltamogramů.



Obr. 4.2.1 Hydrodynamické voltamogramy sulfamethizolu vyhodnocené z výšek píků (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze B-R pufr o zvoleném pH (3,4,5,6) : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v mobilní fázi).



Obr. 4.2.2 Hydrodynamické voltamogramy sulfamethizolu vyhodnocené z ploch píků (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze B-R pufr o zvoleném pH (3,4,5,6) : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl roztoku sulfamethizolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v mobilní fázi).

4.2.2 Kalibrační závislost

Za zjištěných vhodných podmínek pro elektrochemickou detekci sulfamethizolu (pH mobilní fáze 3 a potenciálu +1,3 V) byla proměřena koncentrační závislost v rozmezí 0,2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ při nastavené citlivosti 100 nA/V.

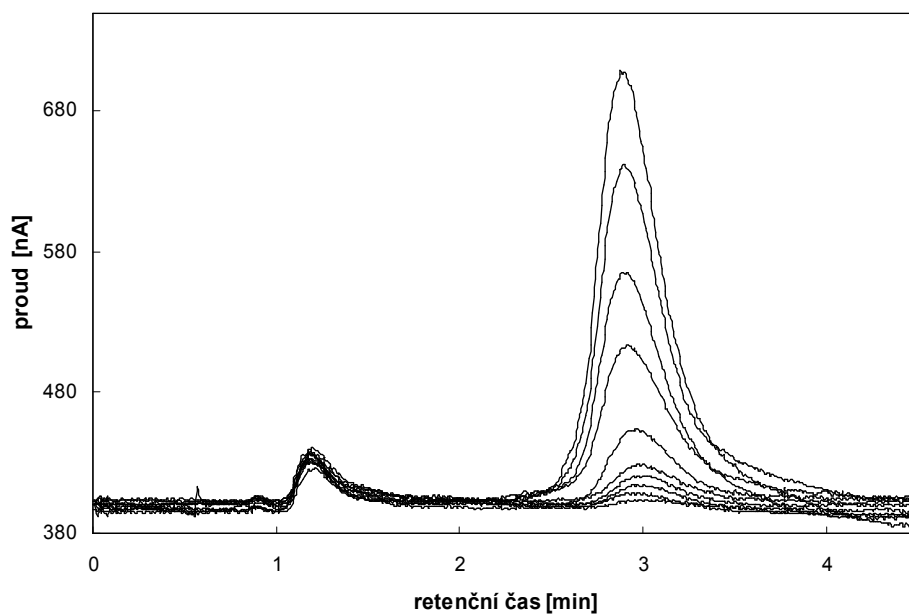
UV detektor předřazený před elektrochemickým detektorem byl použit pouze pro kontrolu funkčnosti detektoru elektrochemického.

Parametry kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí 0,2 až 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, 1 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly zpracovány metodou lineární regrese. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.2.1 a Tab. 4.2.2.

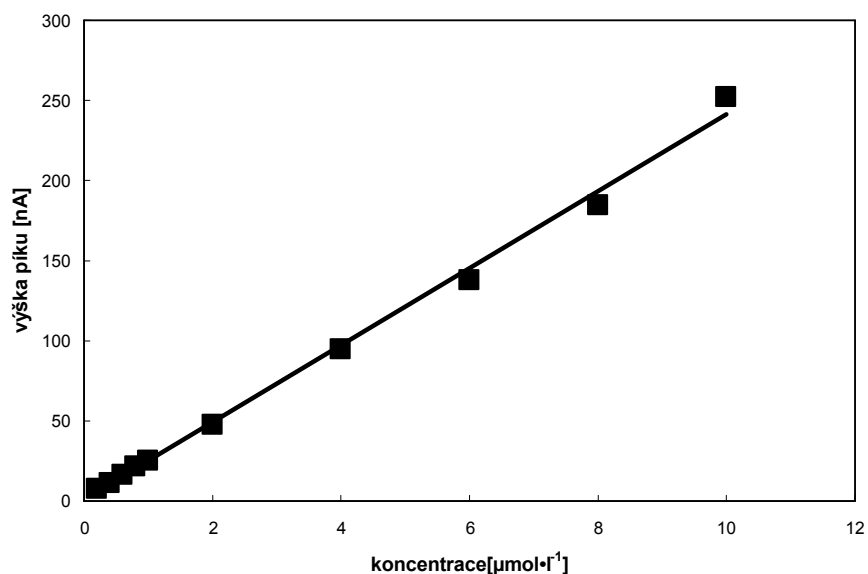
Chromatogramy sulfamethizolu v rozmezí koncentrací 0,2 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ jsou uvedeny na Obr. 4.2.3. Kalibrační závislost z výšek píků pro rozmezí koncentrací sulfamethizolu 0,2 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ je ukázána na Obr. 4.2.4. Na Obr. 4.2.5 je znázorněna kalibrační závislost vynesená z ploch píků v témže koncentračním rozmezí. Na Obr. 4.2.6 a Obr. 4.2.7 jsou pak zobrazeny koncentrační závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozsahu (0,2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Koeficienty determinace se pohybují v rozmezí 0,9996 až 0,9938. Z tohoto rozmezí koeficientů determinace vybočuje pouze hodnota získaná z ploch píků u nejnižšího koncentračního rozsahu. Je to způsobeno šumem základní linie a tedy větší chybou při odečtu z chromatogramu. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozsahu.

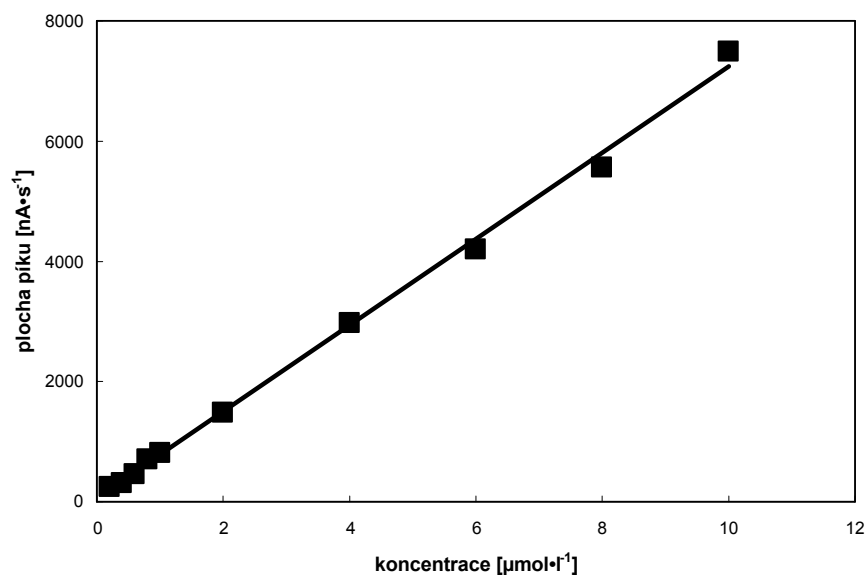
Dosažená mez detekce je 0,041 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.



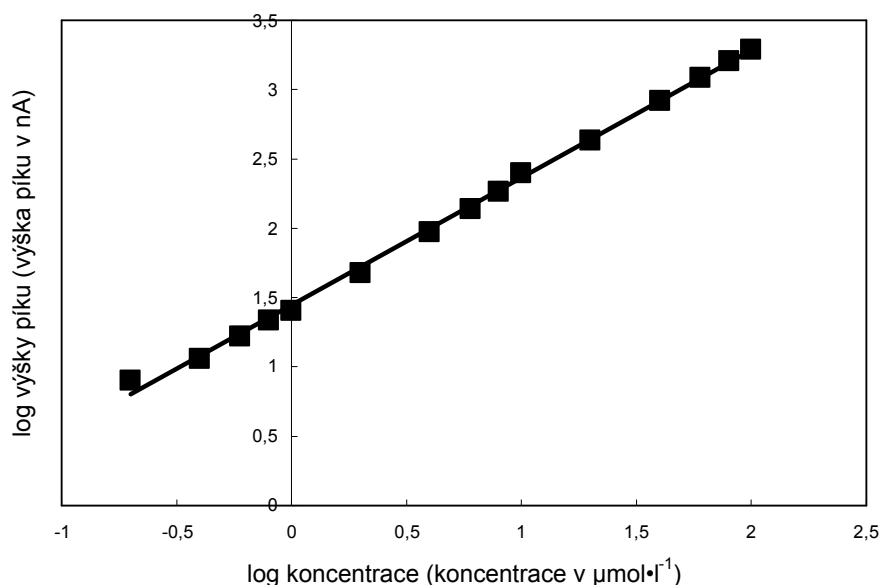
Obr. 4.2.3 Chromatogramy sulfamethizolu v rozmezí koncentrací 0,2 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



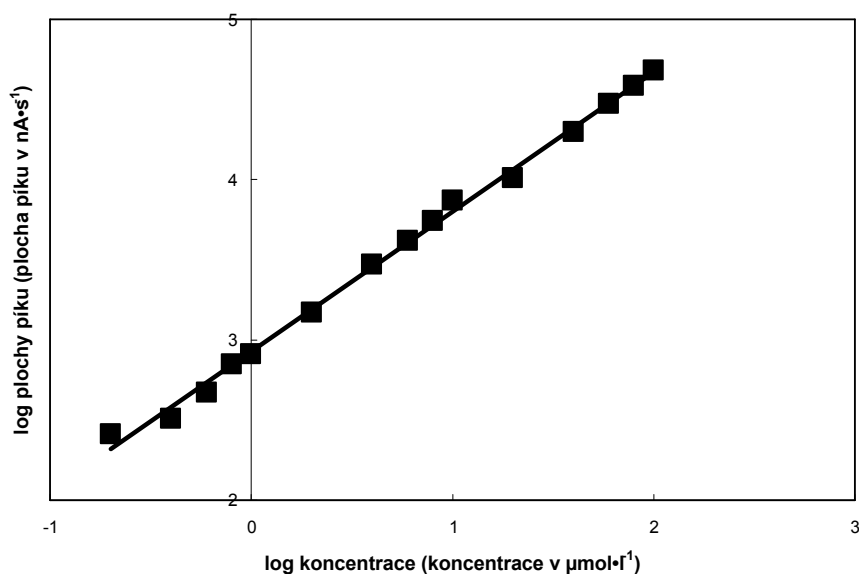
Obr. 4.2.4 Kalibrační závislost sulfamethizolu vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 0,2 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.2.5 Kalibrační závislost sulfamethizolu vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 0,2 až 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.2.6 Kalibrační závislost sulfamethizolu v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 0,2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.2.7 Kalibrační závislost sulfamethizolu v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 0,2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v mobilní fázi, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).

Tab 4.2.1 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení sulfamethizolu: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

Koncentrační rozmezí [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	R^2
0,2 – 1	22,9	3,1	0,9951
1 – 10	24,5	- 2,5	0,9938
10 – 100	19,2	61,5	0,9996
0,2 – 100	19,8	18,4	0,9991

Závislost log výšky píku na log koncentrace: směrnice: 0,919; úsek: 1,45; R^2 : 0,9981

Tab 4.2.2 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení sulfamethizolu: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V. Vyhodnoceno z ploch píků.

Koncentrační rozmezí [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [$\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$]	R^2
0,2 – 1	756,3	64,3	0,9683
1 – 10	721,8	33,2	0,9951
10 – 100	461,1	1955,0	0,9986
0,2 – 100	477,1	842,2	0,9979

Závislost log plochy píku na log koncentrace: směrnice: 0,872; úsek: 2,93; R^2 : 0,9966

4.2.3 Opakovatelnost měření

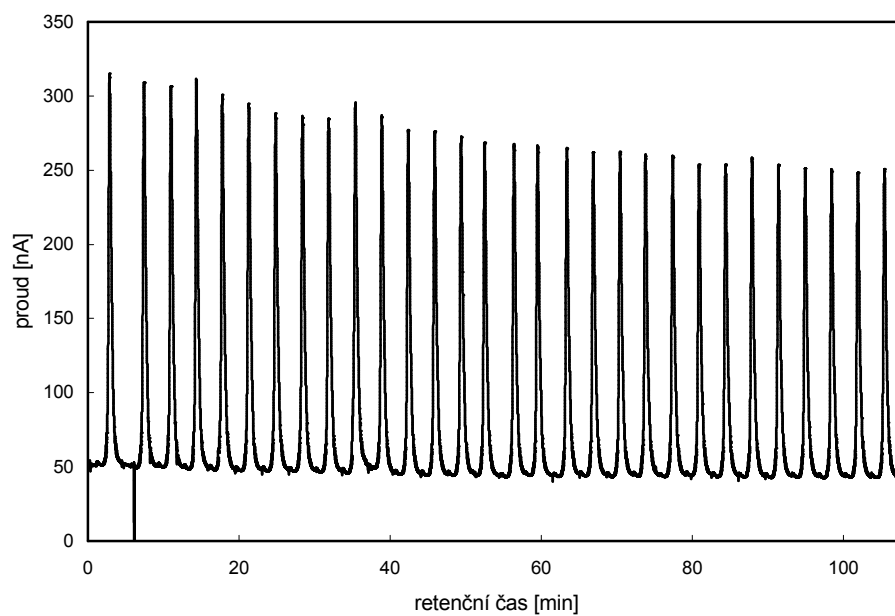
Opakovatelnost měření byla zjištěna pomocí 30 po sobě v pravidelných intervalech následujících nástřicích $20\ \mu\text{l}\ 1\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sulfamethizolu za podmínek zvolených pro měření kalibrační závislosti.

Elektroda se v průběhu měření pasivuje. V průběhu 10 měření klesla výška píku o 10 % původní výšky. Na snížení míry pasivace nemá vliv ani doba omývání elektrody mobilní fází mezi jednotlivými nástřiky, ani použití $1\cdot 10^{-5}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku analytu pro nástřik na kolonu. Povrch pracovní uhlíkové pastové elektrody musí tedy být obnovován alespoň po každém pátem měření.

V tabulce 4.2.3 jsou zaznamenány vybrané hodnoty výšky a plochy píků. Chromatogram sulfamethizolu je uveden na obrázku 4.2.8.

Tab. 4.2.3 Opakovatelnost měření: elektrochemická detekce v HPLC (mobilní fáze B-R pufr o pH 3 : methanol v poměru 70:30 (V/V), průtok $1\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, potenciál 1,3 V, dávkovaný objem $20\ \mu\text{l}\ 1\cdot 10^{-4}\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok sulfamethizolu v mobilní fázi).

Číslo píku	Výška píku [nA]	Plocha píku [nA·s ⁻¹]
1	264,6	8126
5	253,6	7851
10	240,1	7440
15	225,1	7035
20	218,5	6616
25	215,2	6588
30	208,5	6458
průměr	229,5	7068
směrodatná odchylka	18,3	557
relativní směrodatná odchylka	8,0	7,9



Obr. 4.2.8 Opakovatelnost měření: elektrochemická detekce v HPLC (mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol v poměru 70:30 (V/V), průtok $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, potenciál 1,3 V, dávkovaný objem $20 \mu\text{l}$ $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok sulfamethizolu v mobilní fázi).

4.3 Optimalizace SPE a stanovení sulfamethizolu v moči

Sulfamethizol byl před samotným stanovením extrahovaný ze vzorku moči extrakcí na tuhé fázi (SPE) na kolonkách LiChrolut® EN, 200 mg, 3 ml se stacionární fází tvořenou polymerem ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. K sorpci nebyl použit stejný typ stacionární fáze, jako je při separaci na HPLC koloně (LiChrolut® RP-18), protože analyt má malou afinitu k tomuto typu stacionární fáze.

Kondicionace extrakčních kolonek před vlastní extrakcí byla podle pokynů výrobce prováděna 3 ml 100% methanolu a poté byla stacionární fáze promyta 1 ml vody. Následně bylo kolonkami prosáto 100 ml roztoku vzorku, ve vodě nebo v moči, upraveného na pH 3 přidávkem koncentrované kyseliny chlorovodíkové. V případě vzorku moči byl vzorek před nadávkováním na kolonku zfiltrován za použití filtračního papíru. Všechna měření byla prováděna na třech extrakčních kolonkách. Pro práci s reálnými vzorky byly kolonky používány opakovaně po promytí 5 ml methanolu.

Vzorky sulfamethizolu v 5 ml methanolu získané SPE byly buď okamžitě použity pro nástřik na HPLC kolonu nebo byly uchovány přes noc v lednici.

Jako první byl testován výtěžek extrakce při použití 5 ml 100% methanolu jako extrakčního činidla. Methanol byl použit jako eluční činidlo, protože sulfamethizol je v methanolu lépe rozpustný než ve vodě, a při následném stanovení sulfamethizolu pomocí HPLC je methanol součástí mobilní fáze. Pro nástřik na HPLC kolonu byl extrakt sulfamethizolu v methanolu naředěn na 50% obsah methanolu ve vzorku B-R pufrům pH 3, aby se předešlo deformaci píků.

Výše uvedeným postupem byly proměřeny koncentrace sulfamethizolu $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ve vzorku (voda) pro optimalizaci extrakce. Tyto koncentrace sulfamethizolu byly zvoleny jako hodnoty, které se dají jako nejnižší očekávat v moči při léčbě močových cest[10]. Následně byl tímto postupem získaným při optimalizaci extrakce proměřen vzorek sulfamethizolu v moči, ale na záznamu chromatogramu zasahoval pík matrice i do oblasti, kde se nachází pík sulfamethizolu (3. minuta). Tímto postupem nelze odečíst pík analytu ani u nejvyšší předpokládané koncentrace sulfamethizolu použité pro kalibrační závislost ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Poté byl zkoumán nižší obsah methanolu v roztoku. Při použití elučního činidla (10 ml) obsahujícího 50 % methanolu se z kolonek sulfamethizol téměř nevymývá (výtěžek extrakce je menší než 4 %), ale téměř veškeré složky moči, které ruší elektrochemickou i

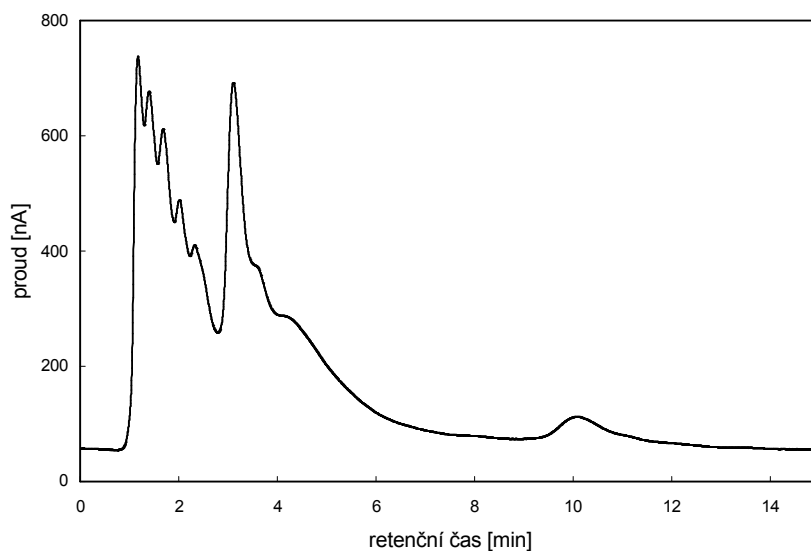
UV detekci sulfamethizolu, se tímto elučním činidlem vymývají. Extrakce byla prováděna z $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoků sulfamethizolu ve vodě upravené na pH 3.

Dále byl testován 70% obsah methanolu v elučním činidlu při extrakci z $1 \cdot 10^{-6}$ a $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoků sulfamethizolu ve vodě. Při 70% obsahu methanolu v roztoku je výtěžek extrakce větší než 90 %.

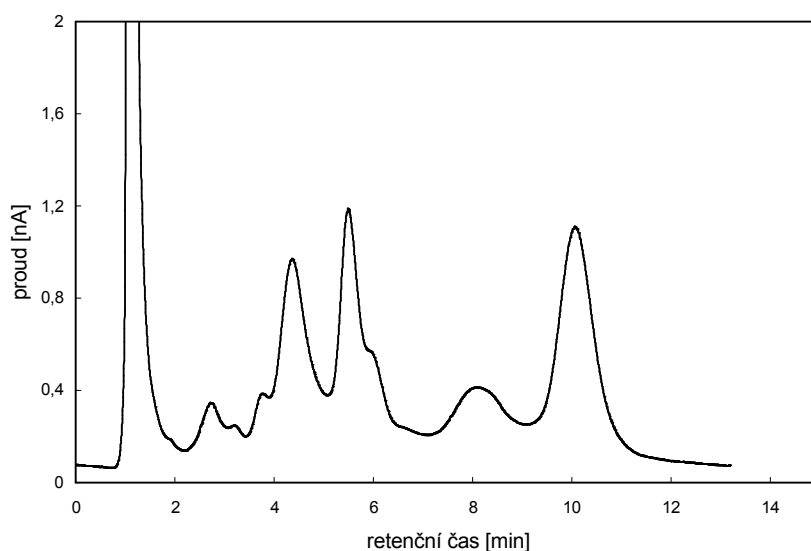
Na Obr. 4.3.1 jsou uvedeny chromatogramy vzorku moči bez přídavku analytu při promytí kolonek 100% methanolem a na Obr. 4.3.2 po promytí 70% methanolem po předchozím promytí 50% roztokem methanolu.

S využitím kombinace účinného vymývání matrice pomocí 50% methanolu a dobré eluční síly 70% methanolu byla provedena optimalizace extrakce ze vzorku sulfamethizolu ve vodě pH 3, kdy byl sorbent s navázaným sulfamethizolem nejprve promyt 10 ml 50% methanolu a následně byla provedena eluce sulfamethizolu pomocí 10 ml 70% methanolu. Výtěžky extrakce získané vyhodnocením výšek píků pro koncentraci $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly $(86,5 \pm 2,70) \%$ a výtěžek z ploch píků byl $(94,6 \pm 3,53) \%$. Výtěžek extrakce pro koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ z výšek píků byl $(89,3 \pm 0,93) \%$ a z ploch píků $(97,7 \pm 2,40) \%$. Vyšší výtěžek extrakce pro vyšší z uvedených koncentrací je způsoben promýváním pomocí 50% methanolu, kdy se analyt vymývá ve stejném množství při obou koncentracích. Vyšší výtěžek získaný vyhodnocením ploch píků je zřejmě způsoben mírným rozmytím píků.

Optimalizovaný postup byl doplněn otestováním výtěžku extrakce $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztoku sulfamethizolu ve vodě upravené na pH 3 za použití výše uvedené kombinace 50% a 70% methanolického roztoku. Výtěžek extrakce byl $(95,5 \pm 4,5) \%$ při vyhodnocení z výšky píku a $(103,2 \pm 4,0) \%$ při vyhodnocení z ploch píku. Tento postup extrakce tedy lze použít pro práci s reálnými vzorky. Takto vzniklý extrakt v 70% methanolickém roztoku byl poté desetkrát zředěn 70% methanolem, aby i nejvyšší koncentrace sulfamethizolu v původním ($1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) vzorku moči spadaly do lineárního dynamického rozsahu kalibrační závislosti (nejvyšší koncentrace je $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$).



Obr. 4.3.1 Chromatogram vzorku moči bez přidavku analytu – extrakce 100% methanolem bez předběžného promytí 50% methanolem (kolona Lichrospher[®], 100-5 μ m, 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μ l slepého vzorku v prostředí methanol : voda 1:1 (V/V), ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.3.2 Chromatogram vzorku moči bez přidavku analytu - extrakce 70 % methanolem po předběžném promytí 50% methanolem (kolona Lichrospher[®], 100-5 μ m, 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μ l slepého vzorku v prostředí methanol : voda 1:1 (V/V), ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).

4.4 HPLC stanovení sulfamethizolu v moči s elektrochemickou a UV detekcí

Stanovení sulfamethizolu v moči bylo prováděno za vhodných podmínek zjištěných při optimalizaci měření. Průtoková rychlost mobilní fáze je $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, pro nástřik na kolonu byl použit roztok sulfamethizolu o dané koncentraci v roztoku methanol : voda 1:1 (V/V), dávkovaný objem byl $20 \text{ } \mu\text{l}$, pH mobilní fáze 3 a potenciál vkládaný na CPE byl $+1,3 \text{ V}$. Kolonky s adsorbovaným sulfamethizolem byly nejprve promyty 10 ml 50% methanického roztoku a následně byla provedena extrakce sulfamethizolu pomocí 10 ml 70% methanolu. Takto připravený vzorek sulfamethizolu v 70% methanolu byl před nástřikem na kolonu desetkrát zředěn (70% methanolem) a doředěn na 50% obsah methanolu vodou.

Kalibrační závislost byla proměřena v rozmezí koncentrací sulfamethizolu v moči 1 až $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při nastavené citlivosti $1 \text{ } \mu\text{A} \cdot \text{V}^{-1}$. Nižší koncentrace než $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ není možné stanovit, protože pík analytu se na chromatogramu objevuje současně s dvěma píky matrice a při nižších koncentracích sulfamethizolu by již správný odečet nebyl možný.

UV detektor předřazený před elektrochemickým detektorem byl použit pouze pro kontrolu funkčnosti detektoru elektrochemického.

Pro ilustraci jsou zde uvedeny chromatogramy sulfamethizolu pro koncentrace sulfamethizolu v moči $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 4.4.1), $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 4.4.2) a $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Obr. 4.4.3).

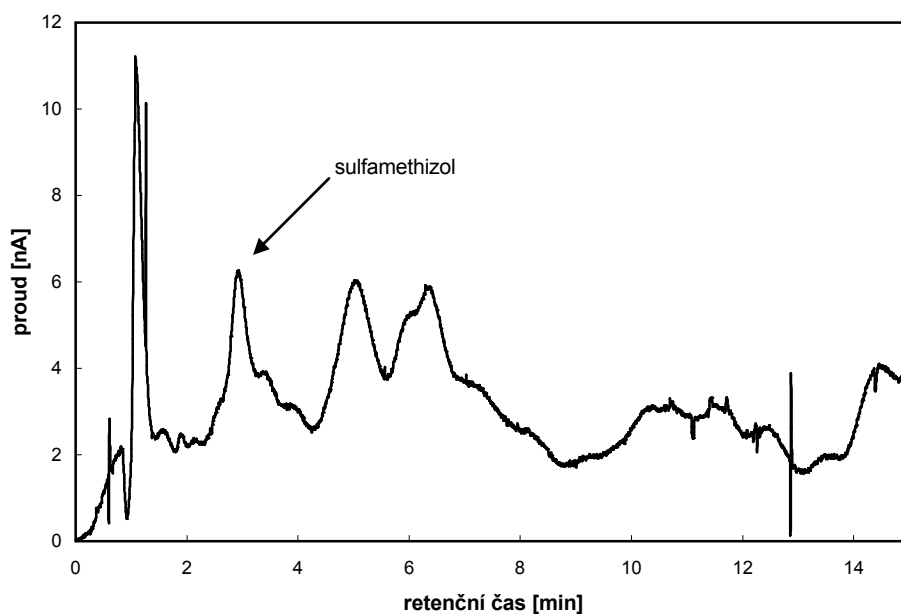
Kalibrační závislost z výšek pík pro rozmezí koncentrací sulfamethizolu 1 až $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ je ukázána na Obr. 4.4.4. Na Obr. 4.4.5 je znázorněna kalibrační závislost vynesena z ploch pík v témže koncentračním rozmezí. Na Obr. 4.4.6 a Obr. 4.4.7 jsou pak zobrazeny tytéž závislosti zpracované v logaritmické formě v celém kalibračním rozsahu.

Parametry kalibračních závislostí pro koncentrační rozmezí 1 až $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a 10 až $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly zpracovány rovněž metodou lineární regrese. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.4.1 a Tab. 4.4.2.

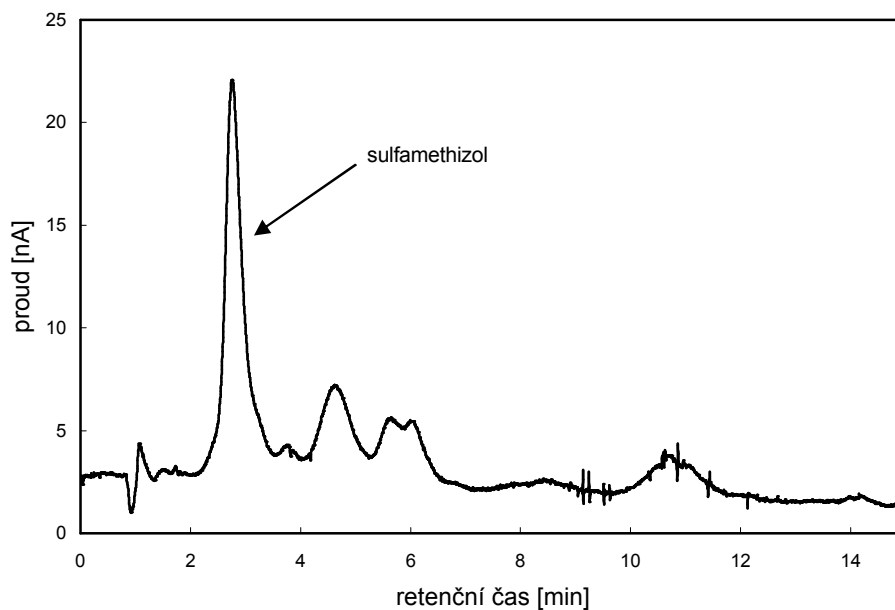
Koeficienty determinace se pohybují v rozmezí $0,7893$ až $0,9939$. Kalibrační závislosti sulfamethizolu v moči vykazují poměrně dobrou linearitu v celém koncentračním rozsahu. Poměrně dobrou linearitu závislostí zde potvrzují i směrnice logaritmických závislostí, jejichž hodnota je blízká 1 . Nižší linearita některých

kalibračních závislostí je zde zřejmě způsobena variabilitou složení matrice vzorku (moč), která nejvíce ovlivňuje korelační koeficienty (koeficienty determinace) u nejnižšího koncentračního rozmezí ($1 - 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

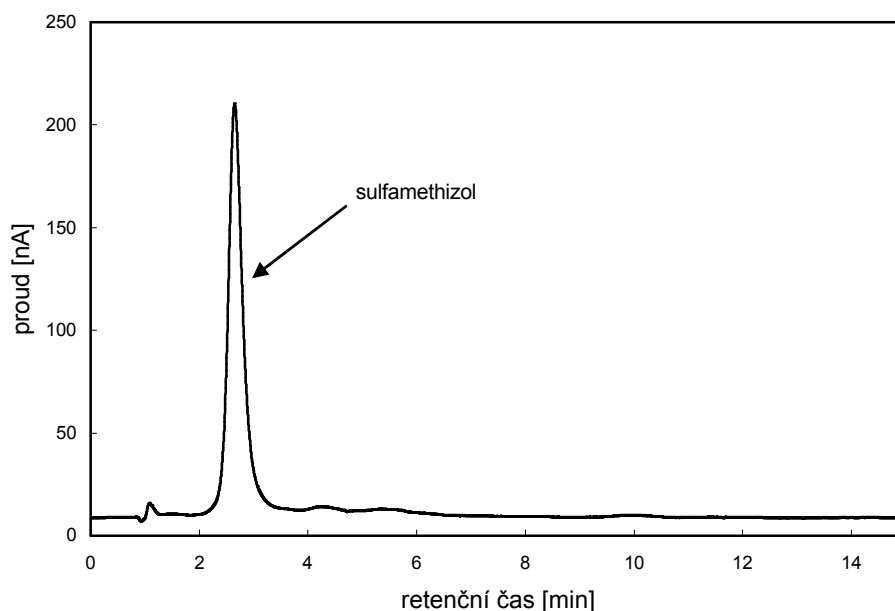
Dosažená mez detekce je $0,34 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota srovnatelná s mezí detekce získanou při optimalizaci metody ($0,04 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), neboť reálný vzorek je desetkrát naředěný. V praxi by však této meze detekce nebylo možné dosáhnout, protože na pozadí píku analytu interferují píky matrice.



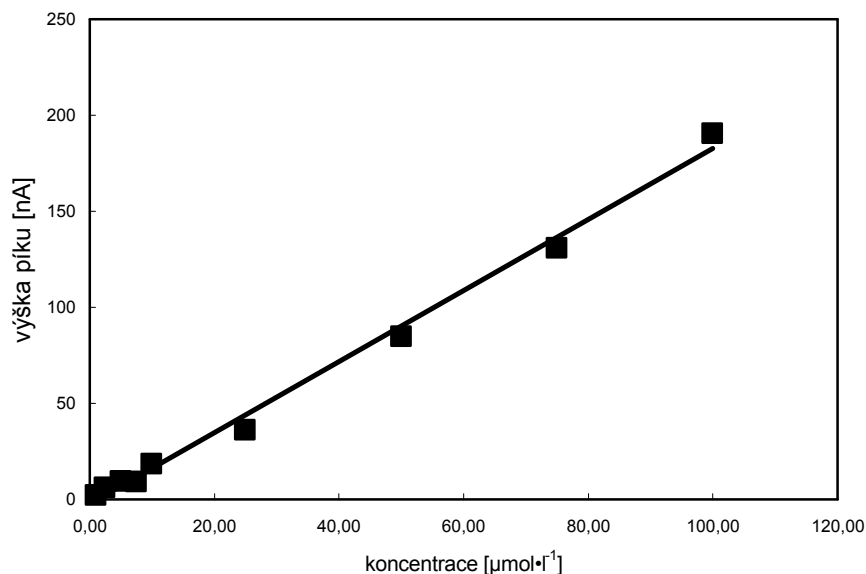
Obr. 4.4.1 Chromatogram sulfamethizolu v moči pro $1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125 \times 4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v methanol : voda 1:1 (V/V), ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



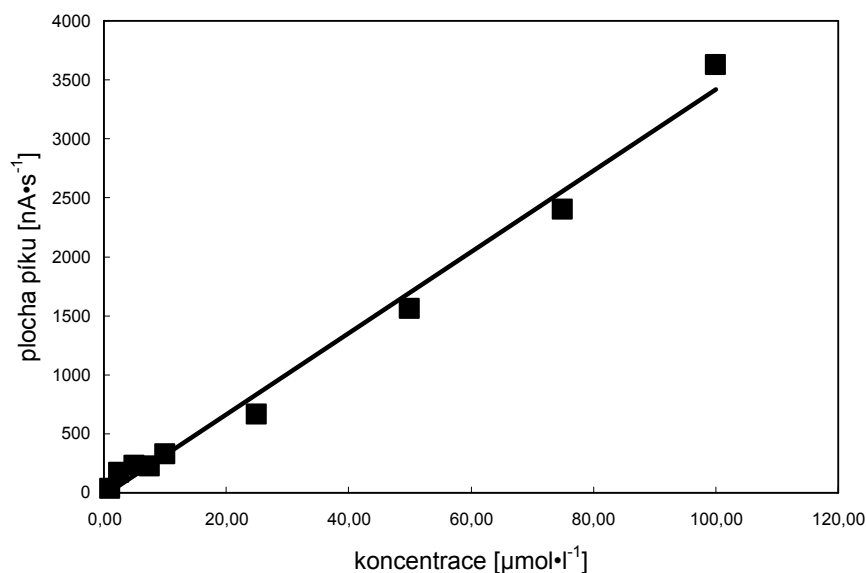
Obr. 4.4.2 Chromatogram sulfamethizolu v moči pro $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v methanol : voda 1:1 (V/V), ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



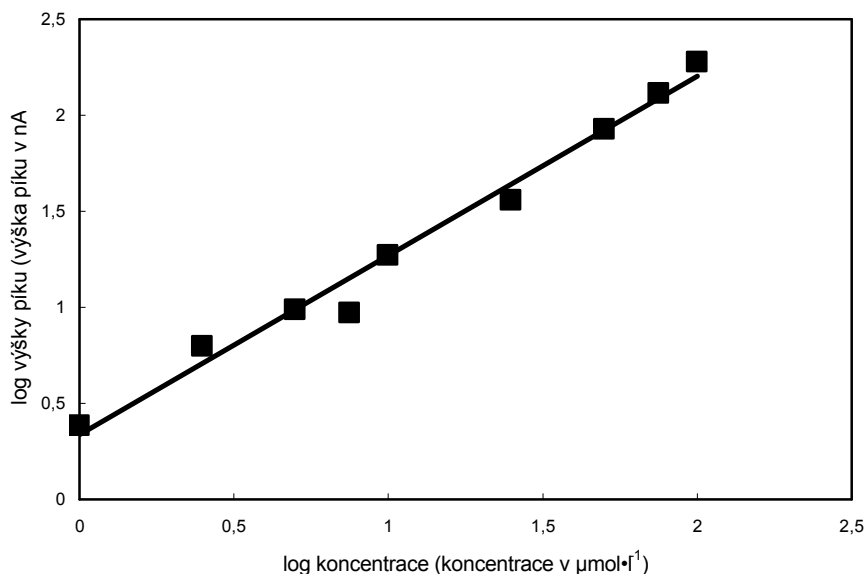
Obr. 4.4.3 Chromatogram sulfamethizolu v moči pro $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl sulfamethizolu v methanol : voda 1:1 (V/V), ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



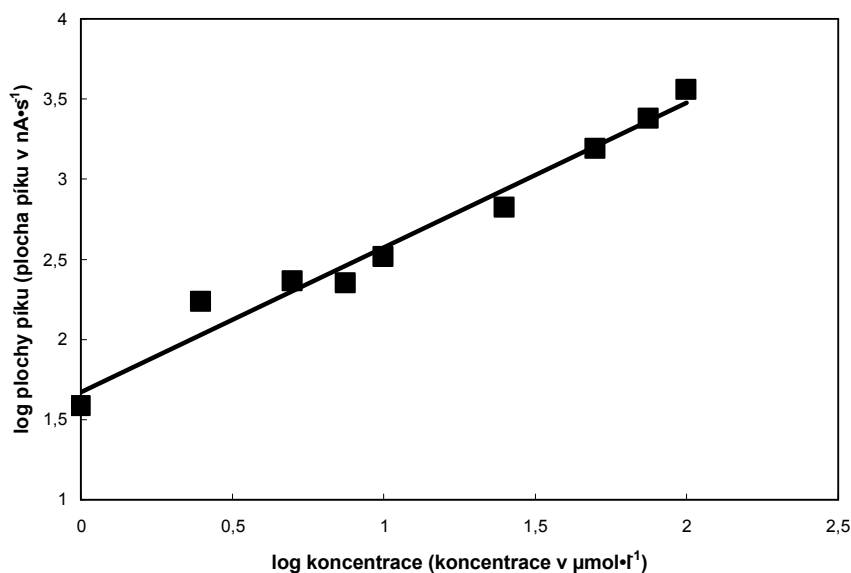
Obr. 4.4.4 Kalibrační závislost sulfamethizolu v moči vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl desetkrát zředěného a na 50% obsah methanolu doředěného extraktu sulfamethizolu, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.4.5 Kalibrační závislost sulfamethizolu v moči vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl desetkrát zředěného a na 50% obsah methanolu doředěného extraktu sulfamethizolu, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.4.6 Kalibrační závislost sulfamethizolu v moči v logaritmické formě vyhodnocená z výšek píků v koncentračním rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl desetkrát zředěného a na 50% obsah methanolu doředěného extraktu sulfamethizolu, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).



Obr. 4.4.7 Kalibrační závislost sulfamethizolu v moči v logaritmické formě vyhodnocená z ploch píků v koncentračním rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kolona Lichrospher[®], 100-5 μm , 125×4 mm, mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 70:30 (V/V), dávkováno 20 μl desetkrát zředěného a na 50% obsah methanolu doředěného extraktu sulfamethizolu, ampérometrická detekce na CPE při potenciálu +1,3 V).

Tab. 4.4.1 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení sulfamethizolu v moči: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V. Vyhodnoceno z výšek píků.

Koncentrační rozmezí [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [nA]	R^2
1 – 10	1,54	1,3	0,8760
10 – 100	1,92	-7,4	0,9925
1 – 100	1,85	-2,3	0,9939

Závislost log výšky píku na log koncentrace: směrnice: 0,832; úsek: 0,386; R^2 : 0,9563

Tab 4.4.2 Parametry kalibračních závislostí pro stanovení sulfamethizolu v moči: HPLC s ampérometrickou detekcí na CPE při potenciálu +1,3 V. Vyhodnoceno z ploch píků.

Koncentrační rozmezí [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Směrnice [$\text{nA}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$]	Úsek [$\text{nA}\cdot\text{s}^{-1}$]	R^2
1 – 10	26,7	61,4	0,8385
10 – 100	36,5	-178,1	0,9889
1 – 100	34,4	-26,1	0,9893

Závislost log plochy píku na log koncentrace: směrnice: 0,902; úsek: 1,67; R^2 : 0,9719

5. Závěr

Bylo prostudováno voltametrické chování sulfamethizolu metodou diferenční pulsní a cyklické voltametrie na uhlíkové pastové elektrodě.

Metodou DPV byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí 4 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v prostředí B-R pufru pH 7. Dosažená mez detekce je 0,39 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Touto metodou byla za optimálních podmínek stanovena koncentrace sulfamethizolu v tabletě léčiva Micturol sedante "fte". Experimentálně zjištěná hmotnost sulfamethizolu v tabletě léčiva ($255,9 \pm 19,7$) mg je ve shodě s hodnotou uváděnou výrobcem (250 mg). Pro ověření této metody bylo použito spektrofotometrické stanovení sulfamethizolu. Nalezená hmotnost sulfamethizolu v tabletě byla ($258,5 \pm 22,7$) mg. Hodnoty získané oběma metodami se statisticky významně neliší ($\alpha = 0,05$), ale použití elektrochemické detekce na CPE je přesto výhodnější, neboť nevyžaduje filtraci vzorku před vlastním stanovením.

Pomocí metody cyklické voltametrie bylo prokázáno, že oxidace sulfamethizolu na CPE je děj řízený difuzí.

Byly optimalizovány podmínky pro HPLC stanovení sulfamethizolu v biologické matrici (moč). Za těchto podmínek (mobilní fáze B-R pufr pH 3 : methanol 7:3, potenciál +1,3 V), byla proměřena kalibrační závislost v rozmezí 0,2 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Získaná mez detekce byla 0,04 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Dále byly optimalizovány podmínky pro extrakci sulfamethizolu z moči na SPE kolonkách typu LiChrolut® EN, 200 mg, 3 ml se stacionární fází tvořenou polymerem ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Extrakce byla prováděna ze 100 ml roztoku sulfamethizolu v moči pH 3. Optimální postup extrakce se skládá z čistícího kroku, kdy je kolonka s adsorbovaným analytem promyta 10 ml 50% methanolu pro odstranění podstatné části interferující matrice a následně provedena eluce sulfamethizolu 70% methanolem.

Vlastní HPLC stanovení bylo prováděno pomocí desetkrát naředěného a na 50% obsah methanolu doředěného vzorku sulfamethizolu. Kalibrační závislost byla proměřena v rozmezí 1 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Dosažená mez detekce je 0,34 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je hodnota srovnatelná s mezí detekce získanou při optimalizaci metody, neboť reálný vzorek je desetkrát naředěný. V praxi by však této meze detekce nebylo možné dosáhnout, protože na pozadí píku analytu interferují píky matrice.

6. Literatura

- 1) <http://www.sigmaaldrich.com>, staženo 20.10.2010.
- 2) http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Sulfamethizolum.htm, staženo 16.4.2012.
- 3) The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals (14th Edition - Version 14.9), Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc.), p. 8916
- 4) B. Melichar a kol.: Chemická léčiva – 3. přepracované vydání. AVICENUM zdravotnické nakladatelství, Praha (1987).
- 5) Service, I. F. I. Dictionary of Food Science and Technology (2nd Edition), International Food Information Service (IFIS Publishing): 38.
- 6) M. Wenke. a kol.: Farmakologie. AVICENUM zdravotnické nakladatelství, Praha (1984).
- 7) www.dailymed.nlm.nih.gov, urobiotic (oxytetracycline hydrochloride, sulfamethizole and phenazopyridine hydrochloride), staženo 20.10.2010.
- 8) L. Bjerrum, B. Gahrn-Hansen, P. Grinsted: Pivmecillinam versus sulfamethizole for short-term treatment of uncomplicated acute cystitis in general practice: A randomized controlled trial. Scandinavian Journal of Primary Health Care 27, p. 6-11 (2009).
- 9) T. Bergan, O. Skjerven: Double blind comparison of short and medium term sulfonamides, sulfamethizole and sulfamethoxazole, in uncomplicated acute urinary tract infections. Scand J Infect Dis 11, p. 219-223 (1979).
- 10) M. B. Kern, N. Frimodt-Møller, F. Espersen,: Urinary concentrations and urine ex-vivo effect of mecillinam and sulphamethizole. Clinical Microbiology and Infection 10, p. 54–61 (2004).
- 11) K. Hirakawa, M. Iida, T. Fuchigami, S. Murata, T. Matsumoto, M. Fujishima: Sulfamethizole absorption test for the assessment of gastric emptying. Comparison with scintigraphic method. Scandinavian journal of gastroenterology 30, p. 133-138 (1995).
- 12) R. J. B. Peters, Y. J. C. Bolck, P. Rutgers, A. A. M. Stolker, M. W. F. Nielen: Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216, p. 8206-8216 (2009).

- 13) J. Abián, M. I. Churchwell, W. A. Korfmacher: High-performance liquid chromatography—thermospray mass spectrometry of ten sulfonamide antibiotics: Analysis in milk at the ppb level. *Journal of Chromatography A* 629, p. 267-276 (1993).
- 14) W. Xu, S. Su, P. Jiang, H. Wang, X. Dong, M. Zhang: Determination of sulfonamides in bovine milk with column-switching high performance liquid chromatography using surface imprinted silica with hydrophilic external layer as restricted access and selective extraction material. *Journal of Chromatography A* 1217, p. 7198-7207 (2010).
- 15) T. A. Gehring, B. Griffin, R. Williams, C. Geiseker, L. G. Rushing, P. H. Siitonen: Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* 840, p. 132-138 (2006).
- 16) M. Villar-Pulido, B. Gilbert-López, J. F. García-Reyes, N. R. Martos, A. Molina-Díaz: Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* 85, p. 1419-1427 (2011).
- 17) Z. A. Fortt, F. C. Cabello, R. A. Buschmann: Residues of tetracycline and quinolones in wild fish living around a salmon aquaculture center in Chile. *Rev Chil Infect* 24, p. 14-18 (2007).
- 18) X. Pan, Z. Qiang, W. Ben, M. Chen: Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China. *Chemosphere* 84, p. 695-700 (2011).
- 19) Collignon, P.; Wegener, H. C.; Braam, P.; Butler, C. D.: The Routine Use of Antibiotics to Promote Animal Growth Does Little to Benefit Protein Undernutrition in the Developing World. *Clinical Infectious Diseases* 41, p. 1007-1013 (2005).
- 20) T. Li, Z.-G. Shi, M.-M. Zheng, Y.-Q. Feng: Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *Journal of Chromatography A* 1205, p. 163-170 (2008).
- 21) J. A. Tarbin, P. Clarke, G. Shearer: Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography–mass-selective detection and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*

- 729, p. 127-138 (1999).
- 22) S. Wang, H. Y. Zhang, L. Wang, Z. J. Duan, I. Kennedy: Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives & Contaminants* 23, p. 362-384 (2006).
 - 23) M. L. Bieganowska, A. Doraczynska-Szopa, A. Petruczynik: The retention behavior of some sulfonamides on different TLC plates. 2. Comparison of the selectivity of the systems and quantitative determination of hydrophobicity parameters. *Journal of Planar Chromatography--Modern TLC* 8, p. 122-128 (1995).
 - 24) I. Švancara, K. Vytřas: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* 88, p. 138–146 (1994).
 - 25) I. Švancara, K. Schachl: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* 93, p. 490–499 (1999).
 - 26) I. Švancara, R. Metelka, K. Vytřas: Sensing in Electroanalysis. (Eds: K. Vytřas, K. Kalcher), University of Pardubice 1, Pardubice (2005).
 - 27) J. Barek a kol.: Možnosti inovací v elektroanalytické chemii. *Pražské analytické centrum inovací*, Praha (2006).
 - 28) N. German, S. Armalis, J. Zima, J. Barek: Voltammetric determination of fluoren-9-ol and 2-acetamidofluorene using carbon paste electrodes. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 70, p. 292-304 (2005).
 - 29) J. Barek, A. Muck, J. Wang, and J. Zima: Study of voltammetric determination of carcinogenic 1-nitropyrene and 1-aminopyrene using a glassy carbon paste electrode, *Sensors* 4, p. 47-57 (2004).
 - 30) K. Vytřas, I. Švancara: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* 88, p. 412-422 (1994).
 - 31) I. Švancara, B. Ogorevc, S. B. Hočevár, K. Vytřas: Perspectives of carbon paste electrodes in stripping potentiometry. *Analytical Sciences* 18, p. 301-305 (2002).